

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-502317

(P2005-502317A)

(43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	D 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	N 4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	4 B O 6 5
	審査請求 有 予備審査請求 未請求	(全 174 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-576286 (P2002-576286)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・9408 0-4990・サウス・サン・フランシス コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(86) (22) 出願日	平成13年3月22日 (2001. 3. 22)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月22日 (2003. 9. 22)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/009552	(72) 発明者	フォン, シャーマン アメリカ合衆国 カリフォルニア 945 02, アラメダ, ベイシンサイド ウェイ 19
(87) 国際公開番号	W02002/077028		
(87) 国際公開日	平成14年10月3日 (2002. 10. 3)		
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, C R, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, S G, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ボールカインポリペプチド及び核酸

(57) 【要約】

本発明は、ボールカインポリペプチド、及びそのポリペプチドをコードする核酸分子に関する。また、ここで提供されているのは、その核酸配列を含むベクター及び宿主細胞、異種ポリペプチド配列と融合している本発明のポリペプチドを含むキメラポリペプチド分子、本発明のポリペプチドと結合する抗体、及び本発明のポリペプチドを生産する方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 図 2 (配列番号: 2) の約 1 又は約 3 4 から約 1 1 1 までのアミノ酸残基の配列を含むボールカインポリペプチドをコードする DNA 分子、又は (b) ボールカイン (a) の DNA 分子の相補鎖を含む単離された核酸分子。

【請求項 2】

図 1 (配列番号: 1) の約 1 6 7 又は約 2 6 9 から約 4 9 9 までのヌクレオチド位置の配列を含む、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 3】

図 1 (配列番号: 1) のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の単離された核酸分子 10

【請求項 4】

A T C C 寄託番号 2 0 9 4 2 4 (DNA 3 9 5 2 3 - 1 1 9 2) で 1 9 9 7 年 1 0 月 3 1 日に A T C C に寄託されたヒトタンパク質 c DNA の全長ポリペプチドコード化配列を含む、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 5】

(a) A T C C 寄託番号 2 0 9 4 2 4 (DNA 3 9 5 2 3 - 1 1 9 2) で 1 9 9 7 年 1 0 月 3 1 日に A T C C に寄託されたヒトタンパク質 c DNA によってコードされる同じ成熟ポリペプチドをコードする DNA 分子、又は (b) (a) の DNA 分子の相補鎖を含む DNA を含む単離された核酸分子。 20

【請求項 6】

寄託番号 2 0 9 4 2 4 (DNA 3 9 5 2 3 - 1 1 9 2) で A T C C に寄託された核酸分子。

【請求項 7】

図 2 (配列番号: 2) のアミノ酸 1 又は約 3 4 から約 1 1 1 までをコードする核酸配列の相補鎖にハイブリダイズする DNA を含んでなるボールカインポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

【請求項 8】

図 2 (配列番号: 2) のアミノ酸 1 又は約 3 4 から約 1 1 1 までをコードする核酸が図 1 (配列番号: 1) のヌクレオチド 1 6 7 又は約 2 6 9 から約 4 9 9 までを含む、請求項 7 30 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 9】

ハイブリダイゼーションが緊縮性ハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で起こる、請求項 7 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の核酸分子を含んでなるベクター。

【請求項 11】

上記核酸分子が、ベクターで形質転換された宿主細胞により認識されるコントロール配列と作用可能に結合している、請求項 10 に記載のベクター。

【請求項 12】

請求項 10 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。 40

【請求項 13】

前記細胞が CHO 細胞、大腸菌細胞又は酵母細胞である、請求項 12 に記載の宿主細胞。

【請求項 14】

ボールカインポリペプチドを製造する方法であって、請求項 12 に記載の宿主細胞を上記ボールカインポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、その細胞培養物から上記ボールカインポリペプチドを回収することを含んでなる方法。

【請求項 15】

図 2 (配列番号: 2) のアミノ酸残基 1 又は約 3 4 から約 1 1 1 までを含んでなる単離されたボールカインポリペプチド。 50

【請求項 16】

A T C C 寄託番号 2 0 9 4 2 4 (D N A 3 9 5 2 3 - 1 1 9 2) で 1 9 9 7 年 1 0 月 3 1 日に A T C C に 寄託されたベクターの c D N A 挿入断片によってコードされる、単離されたボールカインポリペプチド。

【請求項 17】

図 2 (配列番号 : 2) のアミノ酸残基 1 又は約 3 4 から約 1 1 1 までの配列を含む単離されたボールカインポリペプチド、又は抗ボールカイン抗体のための結合部位を提供するのに十分なその断片。

【請求項 18】

(i) 試験 D N A 分子を (a) 図 2 (配列番号 : 2) の 1 又は約 3 4 から約 1 1 1 までのアミノ酸残基の配列を含むボールカインポリペプチドをコードする D N A 分子、又は (b) (a) の D N A 分子の相補鎖と緊縮性条件下でハイブリダイズさせ、(i i) 上記ポリペプチドの発現に適した条件下で上記試験 D N A 分子を含んでなる宿主細胞を培養し、(i i i) 細胞培養物から上記ポリペプチドを回収することによって製造される単離されたポリペプチド。

10

【請求項 19】

異種アミノ酸配列に融合したボールカインポリペプチドを含んでなるキメラ分子。

【請求項 20】

上記異種アミノ酸配列がエピトプタグ配列である、請求項 19 に記載のキメラ分子。

【請求項 21】

上記異種アミノ酸配列が免疫グロブリンの F c 領域である、請求項 19 に記載のキメラ分子。

20

【請求項 22】

ボールカインポリペプチドと特異的に結合する抗体。

【請求項 23】

上記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 22 に記載の抗体。

【請求項 24】

上記抗体がヒト化抗体又は抗体断片である、請求項 22 に記載の抗体。

【請求項 25】

ボールカインポリペプチドのアゴニスト。

30

【請求項 26】

ボールカインポリペプチドのアンタゴニスト。

【請求項 27】

(a) ボールカインポリペプチド、(b) ボールカインポリペプチドのアゴニスト、(c) ボールカインポリペプチドのアンタゴニスト、又は (d) 抗ボールカイン抗体を、製薬的に許容可能な担体と組合わせて含有する組成物。

【請求項 28】

哺乳動物における免疫関連疾患の治療に有用な、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

(a)、(b)、(c) 又は (d) が、(i) 哺乳動物における T リンパ球の増殖を増大させるか、又は (i i) 炎症性細胞の哺乳動物の組織への浸潤を増大させることができる、請求項 27 に記載の組成物。

40

【請求項 30】

(a)、(b)、(c) 又は (d) の治療的有効量を含んでなる、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 31】

容器；

上記容器上のラベル；及び

(a) 請求項 17 に記載のポリペプチド、(b) 上記ポリペプチドのアゴニスト、(c) 上記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は (d) 上記ポリペプチドと結合する抗体を含んで

50

なり、上記容器に収容された組成物を含み、上記容器上のラベルが上記組成物を免疫関連疾患の治療に使用可能であることを示している、製造品。

【請求項 3 2】

それを必要とする哺乳動物の免疫関連疾患を治療する方法であって、(a) 請求項 1 7 に記載のポリペプチド、(b) 上記ポリペプチドのアゴニスト、(c) 上記ポリペプチドのアンタゴスト、又は(d) 上記ポリペプチドと結合する抗体の治療的有効量を上記哺乳動物に投与することを含んでなる方法。

【請求項 3 3】

免疫関連疾患が、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ様関節炎、骨関節炎、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症、特発性炎症ミオパシー、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少、甲状腺炎、真性糖尿病、免疫媒介腎疾患、中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、特発性脱髄性多発神経障害、ギラン-バレー症候群、慢性炎症脱髄性多発神経障害、肝胆道疾患、感染性又は自己免疫慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、肉芽腫性肝炎、硬化性胆管炎、炎症性腸疾患、グルテン過敏性腸疾患、ウィップル病、自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、水疱性皮膚疾患、多形性紅斑、接触性皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症、蕁麻疹、肺の免疫疾患、好酸球性肺炎、特発性肺線維症、過敏性間質肺炎、移植関連疾患、拒絶反応又は移植片対宿主疾患である、請求項 3 2 に記載の方法。

10

【請求項 3 4】

ボールカインポリペプチドを含んでいると疑われる試料中のボールカインポリペプチドの存在を決定する方法であって、該方法が抗ボールカイン抗体に上記試料を曝露し、上記試料の構成成分との上記抗体の結合を測定することを含んでなる方法。

20

【請求項 3 5】

哺乳動物の免疫関連疾患を診断する方法であって、(a) 哺乳動物から得た組織細胞の被験試料中、及び(b) 同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料中における、ボールカインポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含んでなり、コントロール試料と比較した被験試料中の上記遺伝子のより高い又はより低いレベルの発現が試験組織細胞が由来する哺乳動物における免疫関連疾患の存在を示すものである方法。

30

【請求項 3 6】

哺乳動物の免疫関連疾患を診断する方法であって、(a) 抗ボールカイン抗体と上記哺乳動物から得た組織細胞の被験試料とを接触させ、(b) 被験試料中における抗体とポリペプチド間の複合体形成を検出することを含んでなり、上記複合体の形成が、被験組織細胞が由来する哺乳動物に免疫関連疾患が存在することを示すものである方法。

【請求項 3 7】

ボールカインポリペプチドの活性を阻害する化合物を同定する方法であって、上記ポリペプチドに正常に応答する細胞を(a) 上記ポリペプチド及び(b) 候補化合物に接触させ、上記細胞の(a) に対する応答性の欠如を測定することを含んでなる方法。

【請求項 3 8】

ボールカインポリペプチドをコードする遺伝子の発現を阻害する化合物を同定する方法であって、上記ポリペプチドを正常に発現する細胞を候補化合物と接触させ、上記遺伝子の発現の欠如を測定することを含んでなる方法。

40

【請求項 3 9】

上記候補化合物がアンチセンス核酸である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

ボールカインポリペプチドの活性を模倣する化合物を同定する方法であって、上記ポリペプチドに正常に応答する細胞を候補化合物と接触させ、上記細胞の上記候補化合物に対する応答性を測定することを含んでなる方法。

【請求項 4 1】

50

Tリンパ球の増殖を刺激する方法であって、Tリンパ球を有効量の(a)ボールカインポリペプチド又は(b)(a)のアゴニストと接触させて、上記Tリンパ球の増殖を刺激することを含んでなる方法。

【請求項42】

Tリンパ球の増殖を阻害する方法であって、Tリンパ球を有効量のボールカインポリペプチドのアンタゴニストと接触させて、上記Tリンパ球の増殖を阻害することを含んでなる方法。

【請求項43】

哺乳動物の組織中への炎症細胞の浸潤を亢進させる方法であって、前記組織に有効量の(a)ボールカインポリペプチド又は(b)(a)のアゴニストを投与して、上記浸潤を亢進させることを含んでなる方法。

10

【請求項44】

上記炎症細胞が単核球、好酸球又は多形核好中球(PMNs)である、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

哺乳動物においてニューロン細胞へのピュリポテント細胞の分化を誘発する方法であって、有効量の(a)ボールカインポリペプチド又は(b)ボールカインポリペプチドのアンタゴニストを投与することを含んでなり、前記細胞が、ニューロンマーカーが検出可能な状態まで分化する方法。

【請求項46】

上記ニューロンマーカーがMAP2である、請求項45に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、一般に、新規なDNAの同定及び単離、並びに新規なポリペプチドの組換え生産に関する。本発明はまたボールカイン(Bolekine)と免疫系及び細胞分化におけるその役割の使用方法にも関する。

【0002】

(発明の背景)

白血球は単球、マクロファージ、好塩基球、及び好酸球を含み、免疫応答において重要な役割を果たしている。これらの細胞はT及び/又はBリンパ球により開始される機構において重要であり、他の炎症性細胞を補充して活性化させ組織破壊に寄与するある範囲のサイトカインを分泌する。

30

従って、白血球がその適切な目的地まで移動し他の細胞と相互作用する調節プロセスの研究は重要である。現在、白血球は血管壁の内皮細胞に沿って転がることにより損傷を受けたあるいは炎症を起こした組織まで移動すると考えられている。この移動は、セレクチンとそのリガンドの間の一過性の相互作用により媒介される。次に、白血球は血管壁に沿って組織内部まで移動しなければならない。この血液からの漏出と管外遊出工程は、またインテグリンとそのリガンドにより媒介される、より安定した白血球-内皮細胞相互作用を促進する細胞活性化を含む。

40

【0003】

ケモカインは構造的に関連したポリペプチドサイトカインの大きなファミリーである。これらの分子は白血球の動きを刺激し、異なった炎症状況における白血球の情報交換を説明する。ケモカインは内皮細胞上で特定の接着分子の発現を媒介し、それらが特定の細胞型を活性化する化学誘因物質をつくりだす。また、ケモカインは特定の細胞型の増殖を刺激し活性化を調節する。これらの活動の双方において、ケモカインは高度の標的細胞特異性を示す。

【0004】

ケモカインファミリーは、二つのアミノ末端システイン残基が直ぐに隣接しているか(C-

50

C)、一つのアミノ酸によって分離しているか(C-X-C)に基づいて二つのサブファミリーに分割される。C-X-Cファミリーのケモカインは一般に好中球と線維芽細胞を活性化させる一方、C-Cケモカインは単球/マクロファージ、好塩基球、好酸球及びTリンパ球を含むより広範なグループ標的細胞に作用する。両方のサブファミリーの既知のケモカインは、Thomson A. (1994) The Cytokine Handbook, 第2版, Academic Press, N.Y.において概説されているように、多くの多様な細胞型により合成される。ケモカインはまた Schall TJ (1994) Chemotactic Cytokines: Targets for Therapeutic Development. International Business Communications, Southborough Mass. pp180-270及びPaul WE (1993) Fundamental Immunology, 第3版, Raven Press, N.Y. pp822-826において概説されている。

10

【0005】

C-X-Cサブファミリーの既知のケモカインには、マクロファージ炎症タンパク質アルファ及びベータ(MIP-1及びMIP-2)、インターロイキン-8(IL-8)及び成長調節タンパク質(GRO-アルファ及びベータ)が含まれる。

MIP-2は最初ハリポ多糖類(LPS)での刺激時にマウスマクロファージ細胞株RAW 264.7により分泌された6kDaのヘパリン結合タンパク質として同定された。MIP-2はケモカインのC-X-C(又はCXCL)サブファミリーのメンバーである。マウスMIP-2はヒト好中球に対して化学走化性であり、マウスの足の裏に注射した場合、局所的好中球浸潤を誘発する。ラットMIP-2はマウスMIP-2に対して86%のアミノ酸相同性を示し、ラット好中球に対して化学走化性であるが、ラット肺泡マクロファージ又はヒト末梢血好酸球又はリンパ球の遊走を刺激しない。また、ラットMIP-2はラット肺泡内皮細胞の増殖を刺激するが線維芽細胞の増殖は刺激しないことが実証されている。

20

【0006】

炎症を生じた又は罹患した組織における異常の診断に対する現在の技術は、臨床的徴候の観察又はホルモン、ポリペプチド又は様々な代謝物に対する体組織又は体液の血清学的検査に主に依存している。問題はこれらの診断法にある。第1に、患者は疾患の初期段階では臨床的徴候を表さないかもしれない。第2に、血清学的検査は浸潤性疾患と遺伝的症候群とを必ずしも区別しない。従って、発現されたケモカインを同定することは、新規な診断法、効果的な治療法の開発、並びに分子的病原の理解の助けとして重要である。

【0007】

今日まで、ケモカインは少なくとも次の症状に関与している：乾癬、炎症性腸疾患、腎疾患、関節炎、免疫媒介脱毛症、脳卒中、脳炎、MS、肝炎等々。また、非ELR含有ケモカインは血管形成誘導の阻害に関与しており、よって、これらのケモカインが腫瘍血管新生及び腫瘍形成においてある役割を有していることを示している。

30

従って、サイトカイン誘導好中球化学誘引物質、例えばMIP-1、MIP-2、並びにその他の関連タンパク質と配列同一性及び類似性を有するポリペプチド及びそれをコードする核酸を同定することが本発明の目的である。

我々はここにボールカイン(Bolekine)ポリペプチドと命名した新規なケモカインファミリーポリペプチドの同定と特徴付けを記載する。

【0008】

(発明の概要)

一実施態様では、本発明はボールカインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。

一態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示された全長アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを伴うか伴わない膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示された全長アミノ酸配列の他に特別に定められた任意の断片を有するボールカインポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約

40

50

84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含む。

【0009】

他の態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示された全長ボールカインポリペプチドcDNAのコード配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くボールカインポリペプチドのコード配列、ここに開示されたシグナルペプチドを伴うか伴わない膜貫通ボールカインポリペプチドの細胞外ドメインのコード配列、又はここに開示された全長アミノ酸配列の他に特に定められた任意の断片のコード配列を含むDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含む。

【0010】

さらなる態様では、本発明は、(a)ここに開示されたATCCに寄託されたヒトタンパク質cDNAの任意のものによりコードされる同じ成熟ポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインが欠失されているか膜貫通ドメインが不活性化されているボールカインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、又はそのようなコード化ヌクレオチド配列に相補的であるものを含んでなる単離された核酸分子を提供し、ここでそのようなポリペプチドの膜貫通ドメインがここに開示される。従って、ここに記載されたボールカインポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考えられる。

【0011】

他の実施態様は、ボールカインポリペプチドコード配列の断片、又はその相補鎖に関し、

10

20

30

40

50

それらは、例えば、場合によっては抗ボールカイン抗体に対する結合部位を含むポリペプチドをコードするボールカインポリペプチドの断片をコードする、ハイブリダイゼーションプローブとして、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとしての用途が見いだされる。そのような核酸断片は通常少なくとも約10のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約15のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約20のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約30のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約40のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約50のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約60のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約70のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約80のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約90のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約100のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約110のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約120のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約130のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約140のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約150のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約160のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約170のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約180のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約190のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約200のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約250のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約300のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約350のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約400のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約450のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約500のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約600のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約700のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約800のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約900のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約1000のヌクレオチド長であり、ここで、「約」という用語は、その参照している長さのプラス又はマイナス10%の参照ヌクレオチド配列長を意味する。ボールカインポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、多くのよく知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを使用して、ボールカインポリペプチドコード化ヌクレオチド配列を他の既知のヌクレオチド配列にアラインメントさせ、どのボールカインポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片(群)が新規であるかを決定することにより常套的に決定することができることに留意される。そのようなボールカインポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の全てがここで考えられる。また考えられるものは、これらのヌクレオチド分子断片によりコードされるボールカインポリペプチド断片、好ましくは抗ボールカイン抗体に対する結合部位を含んでなるボールカインポリペプチド断片である。

【0012】

他の実施態様では、本発明は、上記で同定された単離核酸配列の任意のものにコードされる単離ボールカインポリペプチドを提供する。

ある態様では、本発明は、ここに開示された全長アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを伴うか伴わない膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示された全長アミノ酸配列の任意の他の特に定められた断片を有するボールカインポリペプチドに対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有しているアミノ酸配列を含む

単離されたボールカインポリペプチドに関する。

【0013】

さらなる態様では、本発明は、ここに開示されたATCCに寄託されたヒトタンパク質cDNAの任意のものによりコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有しているアミノ酸配列を含む単離されたボールカインポリペプチドに関する。

10

【0014】

特定の態様では、本発明は、N末端シグナル配列及び/又は開始メチオニンを持たない単離されたボールカインポリペプチドを提供し、それは上述したそのようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によりコードされる。これを生産する方法もまたここに記載され、ここで、これらの方法はボールカインポリペプチドの発現に適した条件下で適当なコード化核酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞を培養し、細胞培養物からボールカインポリペプチドを回収することを含んでなる。

20

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインが欠失されたか膜貫通ドメインが不活性化された単離されたボールカインポリペプチドを提供する。これを生産する方法もまたここに記載され、ここで、これらの方法はボールカインポリペプチドの発現に適した条件下で適当なコード化核酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞を培養し、細胞培養物からボールカインポリペプチドを回収することを含んでなる。

さらに他の実施態様では、本発明は、ここで定められる天然ボールカインポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストに関する。特定の態様では、アゴニスト又はアンタゴニストは抗ボールカイン抗体又は小分子である。

30

【0015】

更なる実施態様では、本発明は、ボールカインポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法に関し、それは、ボールカインポリペプチドを候補分子と接触させ、上記ボールカインポリペプチドによって媒介される生物学的活性をモニターすることを含む。好ましくは、ボールカインポリペプチドは天然ボールカインポリペプチドである。

また更なる実施態様では、本発明は、ボールカインポリペプチド、又はここに記載するボールカインポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗ボールカイン抗体を、担体と組み合わせて含有する組成物に関する。場合によっては、担体は薬学的に許容される担体である。

40

本発明の他の実施態様は、ボールカインポリペプチド、又は上記したようなそのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗ボールカイン抗体の、ボールカインポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニスト又は抗ボールカイン抗体に应答性の病状の治療に有用な医薬の調製のための使用に関する。

【0016】

本発明の他の実施態様では、本発明は、ここに記載の任意のポリペプチドをコードするDNAを含んでなるベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含んでなる宿主細胞もまた提供される。例としては、宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又は酵母であってもよい。ここに記載の任意のポリペプチドの製造方法が更に提供され、それは、宿主細胞を所

50

望のポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培地から所望のポリペプチドを回収することを含む。

他の実施態様では、本発明は、異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合した、ここに記載の任意のポリペプチドを含んでなるキメラ分子を提供する。そのようなキメラ分子の例は、エピトープタグ配列又は免疫グロブリンのFc領域に融合したここに記載の任意のポリペプチドを含む。

更に他の実施態様では、本発明は、上記又は下記のポリペプチドの任意のものに特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片又は一本鎖抗体である。

【0017】

更に他の実施態様では、本発明は、ゲノム及びcDNAヌクレオチド配列を単離し、関連遺伝子の発現を測定又は検出するために、又はアンチセンスプローブとして有用でありうるオリゴヌクレオチドプローブを提供し、ここでそのプローブは上記又は下記のヌクレオチド配列の任意のものから誘導されうる。好適なプローブ長は上述の通りである。

更に他の実施態様では、本発明は以下の実施例において提示した機能性生物学的アッセイに基づいて様々な用途に対して本発明のボールカインポリペプチドを使用する方法に関する。

更に他の実施態様では、本発明は実施例10に提示されたように免疫細胞の増殖を増加させる方法に関する。

更に他の実施態様では、本発明は実施例11に提示されたように血管透過性を増加させる使用方法に関する。

【0018】

(好適な実施態様の詳細な説明)

I. 定義

ここで使用される際の「ボールカイン」という用語は、天然配列ポリペプチド及びポリペプチド変異体(ここで更に詳細に定義する)を含む。ここで記載されているボールカインポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離され、あるいは組換え又は合成方法によって調製されうる。「ボールカインポリペプチド」という用語は、ここで開示されている各個々のボールカインポリペプチドを指す。「ボールカインポリペプチド」を指すこの明細書中の全ての開示は、各ポリペプチドのそれぞれも組み合わせものも指す。例えば、その調製、その精製、その誘導、それへの又はそれに対する抗体の形成、その投与、それを含有する組成物、それでの疾患の治療等々の記述は、本発明の各ポリペプチドのそれぞれに関係する。また、「ボールカインポリペプチド」という用語は、ここに開示されているボールカインポリペプチドの変異体を含む。

【0019】

「天然配列ボールカインポリペプチド」は、天然由来の対応するボールカインポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでいる。このような天然配列ボールカインポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生産することもできる。「天然配列ボールカインポリペプチド」という用語には、特に、特定のボールカインポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明の種々の実施態様では、ここに開示されている天然配列ボールカインポリペプチドは、添付図に示されている完全長アミノ酸配列を含有する成熟又は完全長天然配列ポリペプチドである。開始及び終止コドンは、図中において太い書体及び下線で示されている。しかし、添付図に開示されているボールカインポリペプチドは図中でアミノ酸位置1としてここに示されたメチオニン残基で始まることが示されているが、図中のアミノ酸位置1より上流又は下流のいずれかに位置する他のメチオニン残基を、ボールカインポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いることも考えられるしまた可能である。

【0020】

10

20

30

40

50

ボールカインポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ECD」は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に持たないボールカインポリペプチドの形態を意味する。通常、ボールカインポリペプチドECDは、そのような膜貫通及び/又は細胞質ドメインを1%未満、好ましくはそのようなドメインを0.5%未満しか持たない。本発明のボールカインポリペプチドについて同定される任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのそのタイプを同定するために当該分野において日常的に使用されている基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初にここで同定されたドメインのいずれかの末端から約5アミノ酸を越えない可能性が高い。従って、ボールカインポリペプチド細胞外ドメインは、場合によっては、実施例又は明細書において同定された膜貫通ドメイン/細胞外ドメイン境界のいずれかの側から約5又はそれ以下のアミノ酸を含みうるし、関連するシグナルペプチドを有するか有しないそのようなポリペプチド及びそれらをコードする核酸は、本発明において考慮される。

10

【0021】

ここに開示する種々のボールカインポリペプチドの「シグナルペプチド」の適切な位置は、本明細書及び/又は添付図に示される。しかし、シグナルペプチドのC-末端境界は変化しうるが、ここで最初に定義したようにシグナルペプチドC-末端境界のいずれかの側で約5アミノ酸未満である可能性が最も高く、シグナルペプチドのC-末端境界は、そのようなタイプのアミノ酸配列成分を同定するのに日常的に使用されている基準に従って同定しうることに留意されたい(例えば、Nielsenら, Prot. Eng. 10: 1-6 (1997)及びvon Heinjeら, Nucl. Acids. Res. 14: 4683-4690 (1986))。さらに、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナルペプチドの切断は完全に均一ではなく、1つ以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここに同定されるシグナルペプチドのC-末端境界の何れかの側の約5アミノ酸未満内で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

20

【0022】

「ボールカインポリペプチド変異体」とは、上記又は下記に定義されるように、ここに開示される完全長天然配列ボールカインポリペプチド、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く完全長天然配列ボールカインポリペプチド配列、シグナルペプチドを伴うか伴わないここに開示されたボールカインの細胞外ドメイン又はここに開示された完全長ボールカインポリペプチドの他の断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する活性なボールカインポリペプチドを意味する。このようなボールカインポリペプチド変異体には、例えば、完全長天然アミノ酸配列のN-又はC-末端に一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたボールカインポリペプチドが含まれる。通常、ボールカインポリペプチド変異体は、ここに開示される完全長天然配列ボールカインポリペプチド配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くボールカインポリペプチド配列、シグナルペプチドを有するか有しないここに開示されたボールカインポリペプチドの細胞外ドメイン又はここに開示された完全長ボールカインポリペプチド配列の任意の他の特に定まった断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有している。通常は、ボールカイン変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸

30

40

50

長、あるいは少なくとも約20アミノ酸長、あるいは少なくとも約30アミノ酸長、あるいは少なくとも約40アミノ酸長、あるいは少なくとも約50アミノ酸長、あるいは少なくとも約60アミノ酸長、あるいは少なくとも約70アミノ酸長、あるいは少なくとも約80アミノ酸長、あるいは少なくとも約90アミノ酸長、あるいは少なくとも約100アミノ酸長、あるいは少なくとも約150アミノ酸長、あるいは少なくとも約200アミノ酸長、あるいは少なくとも約300アミノ酸長、又はそれ以上である。

【0023】

ここで特定されるボールカインポリペプチドに対する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとして、特定のボールカインポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegaAlign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供されている配列比較プログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表1に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントンD.C.、20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから好適に入手可能であり、あるいは下記の表1に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX（登録商標）V4.0Dでの使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータがALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

10

20

【0024】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性（あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる）は次のように計算される：

30

分率 X/Y の100倍

ここで、XはA及びBの配列アラインメントプログラムALIGN-2においてその配列アラインメントプログラムによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた%アミノ酸配列同一性の計算の例として、表2及び3は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「ボールカイン」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸配列同一性の計算方法を示し、ここで「ボールカイン」は対象となる仮説的ボールカインポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」は対象となる「ボールカイン」ポリペプチドが比較されているポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「X」、「Y」及び「Z」はそれぞれ異なった仮説的アミノ酸残基を表す。

40

【0025】

特に断らない限りは、ここでの全ての%アミノ酸配列同一性値は上記のようにALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%アミノ酸配列同一性値は、WU-BLAST-2コンピュータプログラム(Altschulら、Methods in Enzymology 266: 460-480(1996))を用いて以下に記載されるようにして決定してもよい。殆どのWU-BLAST-2検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されないもの、即ち調節可能なパラメータは

50

以下の値に設定する：オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値 (T) = 11、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62。WU-BLAST2が用いられる場合には、%アミノ酸配列同一性値は、(a)天然ボールカインポリペプチドから誘導された配列を有する対象とするボールカインポリペプチドのアミノ酸配列と、対象とする比較アミノ酸配列(すなわち、対象とするボールカインポリペプチドが比較されるボールカインポリペプチド変異体であってもよい配列)との間の、WU-BLAST-2によって決定した一致する同一アミノ酸残基の数を、(b)対象とするボールカインポリペプチドの残基の総数で除した商によって決定される。例えば、「アミノ酸配列Bに対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を持つ又は持っているアミノ酸配列Aを含んでなるポリペプチド」という表現では、アミノ酸配列Aが対象の比較アミノ酸配列であり、アミノ酸配列Bが対象のボールカインポリペプチドのアミノ酸配列である。

10

【0026】

また、%アミノ酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschulら, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードでき、又は別な方法で米国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランドから得ることができる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパス e-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62を含む。

20

【0027】

アミノ酸配列の比較にNCBI-BLAST2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される：

分率 X / Y の 100 倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のA及びBのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

30

【0028】

「ボールカイン変異体ポリヌクレオチド」又は「ボールカイン変異体核酸配列」とは、下記に定義されるように、活性ボールカインポリペプチドをコードし、ここに開示する完全長天然配列ボールカインポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた完全長天然配列ボールカインポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するボールカインポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長ボールカインポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列と少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する核酸分子を意味する。通常、ボールカイン変異体ポリペプチドは、ここに開示する完全長天然配列ボールカインポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた完全長天然配列ボールカインポリペプチド配列、シグナル配列を有する又は有しないここに開示するボールカインポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長ボールカインポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列と、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配

40

50

列同一性、あるいは少なくとも約 93% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 94% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 95% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 96% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 97% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 98% の核酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約 99% の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。

【0029】

通常は、ボールカイン変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約 30 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 60 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 90 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 120 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 150 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 180 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 210 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 240 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 270 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 300 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 450 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 600 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 900 ヌクレオチド長、又はそれ以上である。

10

【0030】

ここで同定されるボールカインコード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、ボールカイン配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供されている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表1に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントン D.C. , 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから好適に入手可能であり、あるいは下記の表1に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標) V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータがALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

20

30

【0031】

核酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Dと、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cと言うこともできる)は次のように計算される:

分率 W/Z の 100 倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアの核酸残基の数であり、ZはDの全核酸残基数である。核酸配列Cの長さがアミノ酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた%核酸配列同一性の計算の例として、表4及び5は「比較DNA」と称される核酸配列の「ボールカイン-DNA」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法を実証し、ここで「ボールカイン-DNA」が対象の仮説的ボールカインコード化核酸配列を表し、「比較DNA」が対象の「ボールカイン-DNA」核酸分子が比較されている核酸配列を表し、「N」、「L」及び「V」はそれぞれ異なった仮説的アミノ酸残基を表す。

40

【0032】

特に断らない限りは、ここでの全ての%核酸配列同一性値は、直ぐ上の段落に示したよう

50

にALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%核酸配列同一性値は、WU-BLAST-2コンピュータプログラム(Altschulら, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて決定してもよい。さらに、殆どのWU-BLAST-2検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する: オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値 (T) = 11、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62。WU-BLAST-2が用いられた場合、%核酸配列同一性値は、(a)天然配列ボールカインポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有する対象とするボールカインポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列と、対象とする比較核酸配列(即ち、対象とするボールカインポリペプチドコード化核酸分子が比較されるボールカインポリペプチド変異体であってもよい配列)との間の、WU-BLAST-2によって決定した一致する同一核酸残基の数を、(b)対象とするボールカインポリペプチドコード化核酸分子のヌクレオチドの総数で除した商によって決定される。例えば、「核酸配列Bに対して少なくとも80%の核酸配列同一性を持つ又は持っている核酸配列Aを含んでなる単離された核酸分子」という表現では、核酸配列Aが対象の比較核酸配列であり、核酸配列Bが対象のボールカインポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

10

【0033】

また、%核酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschulら, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードでき、又は別な方法で米国国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランドから得ることができる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパス e-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62を含む。

20

【0034】

核酸配列比較にNCBI-BLAST2が用いられる状況では、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性(あるいは、与えられた核酸配列Dと、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cと言うこともできる)は次のように計算される:

30

分率 W/Z の100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアの核酸残基の数であり、ZはDの全核酸残基数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

【0035】

他の実施態様では、ボールカイン変異体ポリヌクレオチドは、活性なボールカインポリペプチドをコードし、好ましくは緊縮性ハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、ここに開示する完全長ボールカインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションする核酸分子である。ボールカイン変異体ポリペプチドは、ボールカイン変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

40

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために使用するときには、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、ポリペプチドは、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離されたポリペプチドには、ボールカインポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成

50

分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのタンパク質が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一つの精製工程により調製される。

【0036】

「単離された」ボールカインポリペプチドコード化核酸又は他のポリペプチドコード化核酸は、同定され、該ポリペプチドをコードする核酸の天然源に通常付随している少なくとも一つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。ゆえに、単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、天然の細胞中に存在する特定のポリペプチドコード化核酸分子とは区別される。しかし、単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるポリペプチドを通常発現する細胞に含まれるポリペプチド核酸分子を含む。

10

「コントロール配列」という表現は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

【0037】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読み枠にあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

20

「抗体」という用語は最も広義に使用され、例えば、単一の抗ボールカインポリペプチドモノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む)、多エピトープ特異性を持つ抗ボールカイン抗体組成物、一本鎖抗ボールカイン抗体、及び抗ボールカイン抗体の断片を特に包含する(下記参照)。ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団、すなわち、構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である集団から得られる抗体を指す。

30

【0038】

ハイブリダイゼーション反応の「緊縮性」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補的鎖がその融点に近いがそれより低い環境に存在する場合における変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をより緊縮性にするが、低い温度は緊縮性を低下させる。さらに、緊縮性は塩濃度に逆比例する。ハイブリダイゼーション反応の緊縮性の更なる詳細及び説明は、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

40

【0039】

ここで定義される「緊縮性条件」又は「高度の緊縮性条件」は、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2)

50

ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42 において50% (v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；(3)42 における50%ホルムアミド、5xSSC(0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5xデンハード液、超音波処理サケ精子DNA(50µg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストラン硫酸と、42 における0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中の洗浄及び55 での50%ホルムアミド、次いで55 におけるEDTAを含む0.1xSSCからなる高緊縮性洗浄を用いるものによって同定される。

10

【0040】

「中程度の緊縮性条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989に記載されているように同定され、上記の緊縮性より低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度及び%SDS)の使用を含む。中程度の緊縮性条件は、20%ホルムアミド、5xSSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハード液、10%デキストラン硫酸、及び20mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の37 での終夜インキュベーション、次いで1xSSC中37-50 でのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識する。

20

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したボールカインポリペプチド、又はそれらのドメイン配列を含むキメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープ、又は幾つかの他の試薬によって同定できるエピトープを提供するに十分な数の残基を有しているが、その長さは対象とするポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8~約50のアミノ酸残基(好ましくは約10~約20のアミノ酸残基)を有する。

30

【0041】

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質(「アドヘシン」)の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインとを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である(すなわち「異種の」)アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3又はIgG-4サブタイプ、IgA(IgA-1及びIgA-2を含む)、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

40

ここでの目的に対する「活性な」又は「活性」とは、天然又は天然に生じるボールカインの生物学的及び/又は免疫学的活性を保持するボールカインポリペプチドの形態を意味し、ここで「生物学的」活性とは、天然又は天然に生じるボールカインが保持する抗原性エピトープに対する抗体の生成を誘発する能力以外の、天然又は天然に生じるボールカインによって引き起こされる生物機能(阻害又は刺激)を意味し、また「免疫学的」活性とは、天然又は天然に生じるボールカインが保持する抗原性エピトープに対する抗体の生成を誘発する能力を意味する。

【0042】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広義に用いられ、ここに開示した天然ボールカインポリペプチドの生物学的活性を部分的又は完全に阻止、阻害、又は中和する任意の分子を含

50

む。同様に「アゴニスト」なる用語は最も広義に用いられ、ここに開示した天然ボールカインポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を含む。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然ボールカインポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、有機小分子等々を含む。ボールカインポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストの同定方法は、ボールカインポリペプチドを候補アンタゴニスト又はアゴニストと接触させ、ボールカインポリペプチドに通常は伴っている一又は複数の生物学的活性の検出可能な変化を測定することを含む。

【0043】

「治療」とは、治癒的処置と予防的療法又は防止的療法の両方を意味し、患者は標的とする病理学的状態又は疾患を防止又は遅延化（減少）させることである。治療が必要な者とは、既に疾患に罹っている者、並びに疾患に罹りやすい者又は疾患が防止されている者を含む。

10

「慢性」投与とは、急性態様とは異なり連続的な態様での薬剤を投与し、初期の治療効果（活性）を長時間に渡って維持することを意味する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ本質的に周期的になされる処置である。

治療のための「哺乳動物」は、ヒト、家庭及び農業用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどを含む哺乳類に分類される任意の動物を意味する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

一又は複数の治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時（同時期）及び任意の順序での連続した投与を含む。

20

【0044】

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる用量及び濃度でそれらに暴露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性pH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン；グルコース、マンノース又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及びノ又は非イオン性界面活性剤、例えば、TWEENTM、ポリエチレングリコール(PEG)、及びPLURONICSTMを含む。

30

【0045】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片；ダイアボディ(diabodies)；直鎖状抗体(Zapataら, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995])；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理はF(ab')₂断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

40

「Fv」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。この配置において各ドメインの3つのCDRが相互作用してV_H-V_L二量体の表面に抗原結合部位を決定する。正しくは、6つのCDRが抗体に対する抗原結合特異性を与える。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでなるFvの半分）でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

【0046】

また、Fab断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)も含

50

む。F a b断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖C H 1ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりF a b'断片と相違する。ここで、F a b'-S Hは、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を持つF a b'を表す。F (a b')₂抗体断片は、最初はF a b'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

任意の脊椎動物種からの抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる二つの明らかに異なる型の一方に分類される。

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは異なるクラスに分類できる。免疫グロブリンの五つの主要なクラス：I g A、I g D、I g E、I g G及びI g Mがあり、それらの幾つかは更にサブクラス(アイソタイプ)、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A及びI g A 2に分類される。

【0047】

「一本鎖F v」又は「s F v」抗体断片は、抗体のV_H及びV_Lドメインを含む抗体断片を含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、F vポリペプチドは、s F vが抗原結合にとって望ましい構造の形成を可能にする、V_H及びV_Lドメイン間のポリペプチドリンカーを更に含む。s F vの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

「ダイアボディ(diabodies)」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小型の抗体断片を意味し、その断片は同じポリペプチド鎖(V_H-V_L)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に結合した重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。同じ鎖の二つのドメイン間に対形成するには短すぎるリンカーを用いることにより、ドメインは強制的に他の鎖の相補的ドメインと対形成して二つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディは、例えば、EP404,097; W093/11161; 及びHollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により十分に記載されている。

【0048】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離及び/又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、その抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、抗体は、(1)ローリー法で測定した場合95重量%を越える抗体、最も好ましくは99重量%を越えるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのS D S - P A G Eによる均一性まで精製される。単離された抗体には、抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一の精製工程により調製される。

「特異的に結合する」抗体、又は特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープへ「特異的な」抗体とは、他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープとは実質的に結合せずに、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープへ結合するものである。

【0049】

「標識」なる語は、ここで用いられる場合、「標識」抗体が生成されるように、抗体に直接又は間接的に抱合している検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識は、それ自身検出可能でもよく(例えば、放射性標識又は蛍光標識)、又は酵素標識の場合、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変換を触媒してもよい。

「固相」とは、本発明の抗体がそれに付着することのできる非水性マトリクスを意味する。ここに意図する固相の例は、部分的又は全体的に、ガラス(例えば、孔制御ガラス)、多糖類(例えばアガロース)、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール

10

20

30

40

50

ル及びシリコンから形成されたものを含む。或る種の実施態様では、内容に応じて、固相はアッセイプレートのウェルを構成することができ；その他では精製カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィーカラム）とすることもできる。また、この用語は、米国特許第4,275,149号に記載されたような、別個の粒子の不連続な固相も包含する。

【0050】

「リポソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤からなる小型の小胞であり、哺乳動物への薬物（ボールカインポリペプチド又はその抗体など）の輸送に有用である。リポソームの成分は、通常は生体膜の脂質配列に類似する二層形式に配列させる。

「小分子」とは、ここで、約500ダルトン未満の分子量を持つと定義される。

ここに開示されたポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの「有効量」とは、特に記載した目的を実施するのに十分な量である。「有効量」は述べられた目的との関連で経験的かつ常套的に決定されうる。

「多能性細胞」は発生系統に固定されない細胞としてここに定義される。

【0051】

【表1】

表1

```

/*
*
* C-C increased from 12 to 15
* Z is average of EQ
* B is average of ND
* match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
*/
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int  _day[26][26] = {
/*  A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2; 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ { _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

10

20

30

40

表 1 (続き)

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX           4      /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT         3      /* value of matching bases */
#define DMIS         0      /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0        8      /* penalty for a gap */
#define DINS1         1      /* penalty per base */
#define PINS0         8      /* penalty for a gap */
#define PINS1         4      /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int           score;      /* score at last jmp */
    long          offset;     /* offset of prev block */
    short         ijmp;       /* current jmp index */
    struct jmp    jp;         /* list of jmps */
};

struct path {
    int           spc;        /* number of leading spaces */
    short         n[JMPS]; /* size of jmp (gap) */
    int           x[JMPS]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char             *ofile;     /* output file name */
char             *namex[2];  /* seq names: getseqs() */
char             *prog;      /* prog name for err msgs */
char             *seqx[2];   /* seqs: getseqs() */
int              dmax;       /* best diag: nw() */
int              dmax0;     /* final diag */
int              dna;        /* set if dna: main() */
int              endgaps;    /* set if penalizing end gaps */
int              gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
int              len0, len1; /* seq lens */
int              ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int              smax;       /* max score: nw() */
int              *xbm;       /* bitmap for matching */
long             offset;     /* current offset in jmp file */
struct           diag       *dx; /* holds diagonals */
struct           path       pp[2]; /* holds path for seqs */

char             *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char             *getseq(), *g_calloc();

```

10

20

30

40

表 1(続き)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
int ac;
char *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0; /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out"; /* output file */

    nw(); /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps(); /* get the actual jmps */
    print(); /* print stats, alignment */

    cleanup(0); /* unlink any tmp files */
}

```

表 1(続き)

```

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/
nw()
{
    char          *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int           *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int           ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int           *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int           mis;               /* score for each type */
    int           ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register      id;                /* diagonal index */
    register      ij;                /* jmp index */
    register      *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
    register      xx, yy;            /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

nw

10

20

30

40

表 1(続き)

```

...nw
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
  mis = col0[yy-1];
  if (dna)
    mis += (xbrn[*px-'A']&xbrn[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
  else
    mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

  /* update penalty for del in x seq;
   * favor new del over ongong del
   * ignore MAXGAP if weighting endgaps
   */
  if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else {
      dely[yy] -= ins1;
      ndely[yy]++;
    }
  } else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else
      ndely[yy]++;
  }

  /* update penalty for del in y seq;
   * favor new del over ongong del
   */
  if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else {
      delx -= ins1;
      ndelx++;
    }
  } else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else
      ndelx++;
  }

  /* pick the maximum score; we're favoring
   * mis over any del and delx over dely
   */

```

表 1(続き)

...NW

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0 + ins1*(len1-yy);
    if (col1[yy] > smax) {
        smax = col1[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0 + ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

10

20

30

40

表 1(続き)

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */
10

#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print() print
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */
    20

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "< first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "< second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
        30
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
    40
}

```

表 1(続き)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
{
    int      lx, ly;                                           /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap;                                  /* leading trailing overlap */

    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char     outx[32];
    double   pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "< %d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
            nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

10

20

30

40

表 1 (続き)

```

fprintf(fx, "< gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n< score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n< score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "< endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "< endgaps not penalized\n");
}

static nm; /* matches in core -- for checking */
static lmax; /* lengths of stripped file names */
static ij[2]; /* jmp index for a path */
static nc[2]; /* number at start of current line */
static ni[2]; /* current elem number -- for gapping */
static siz[2];
static char *ps[2]; /* ptr to current element */
static char *po[2]; /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int nn; /* char count */
    int more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

10

20

30

pr_align

40

表 1 (続き)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i] + +];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i] + +];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nm = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

10

20

30

40

dumpblock

表 1 (続き)

...dumpblock

```

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int ix; /* index in out[] holding seq line */
{
    char nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int ix;
{

```

10

20

30

40

nums

putline

表 1(続き)

```

int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbrm[*p0-'A']&xbrm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}
}

```

...putline

10

stars 20

30

40

表 1(続き)

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}
```

stripname

表 1(続き)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_alloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";      /* tmp file for jumps */
FILE    *fj;                               10

int      cleanup();                          /* cleanup tmp file */
long     lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                  cleanup
{
    int    i;
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);                                20
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                           getseq
{
    char    *file;    /* file name */
    int     *len;     /* seq len */

    char    line[1024], *pseq;
    register char    *px, *py;
    int     natgc, tlen;
    FILE    *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
}

```

表 1(続き)

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_malloc(msg, nx, sz)
char *msg;          /* program, calling routine */
int nx, sz;         /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_malloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;

```

...getseq

10

g_malloc

20

30

readjmps

40

表 1 (続き)

...readjumps

```

    if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

表 1(続き)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                writejmps
{
    int    ix;
    char    *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

【 0 0 5 2 】 20
 【 表 2 】

表 2

PRO	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(長さ = 15 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXXXYYYYYYY	(長さ = 12 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定される2つのポリペプチド配列間において等しく一致するアミノ酸残基数の)

30

÷ (PROポリペプチドのアミノ酸残基数の総数 =

5 ÷ 15 = 33.3%

【 0 0 5 3 】
 【 表 3 】

表3

PRO	XXXXXXXXXX	(長さ = 10 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXYYYYYZZYZ	(長さ = 15 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定される2つのポリペプチド配列間において等しく一致するアミノ酸残基の数)
 ÷ (PROポリペプチドのアミノ酸残基の総数) =

10

$$5 \div 10 = 50\%$$

【 0 0 5 4 】

【 表 4 】

表4

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(長さ = 14ヌクレオチド)
比較 DNA	NNNNNNLLLLLLLLLL	(長さ = 16ヌクレオチド)

20

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定される2つの核酸配列間において等しく一致するヌクレオチドの数)
 ÷ (PRO-DNA核酸配列のヌクレオチドの総数) =

$$6 \div 14 = 42.9\%$$

30

【 0 0 5 5 】

【 表 5 】

表5

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ = 12ヌクレオチド)
比較 DNA	NNNNLLLTV	(長さ = 9ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定される2つの核酸配列間において等しく一致するヌクレオチドの数)
 ÷ (PRO-DNA核酸配列のヌクレオチドの総数) =

40

$$4 \div 12 = 33.3\%$$

【 0 0 5 6 】

I I . 本発明の組成物と方法

A . 完全長ボールカインポリペプチド

50

本発明は、本出願でボールカインポリペプチドと呼ばれるポリペプチドをコードする新規に同定され単離された核酸配列を提供する。特に下記の実施例でさらに詳細に説明するように、種々のボールカインポリペプチドをコードするcDNAが同定され単離された。しかしながら、単純化のために、本明細書において、ここに開示した完全長天然核酸分子にコードされるタンパク質並びに上記のボールカインの定義に含まれる更なる天然相同体及び変異体は、それらの由来又は調製方法に関わらず、ボールカインと称する。

下記の実施例に開示されるように、ボールカインcDNAクローンはATCCに寄託されている。これらのクローンの実際のヌクレオチド配列は、この分野で日常的な方法を用いて寄託されたクローンを配列決定することにより容易に決定することができる。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。ここに記載したボールカインポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。

10

【0057】

B. ボールカインポリペプチド変異体

ここに記載した完全長天然配列ボールカインポリペプチドに加えて、ボールカイン変異体も調製できると考えられる。ボールカイン変異体は、ボールカインDNAに適当なヌクレオチド変化を導入することにより、あるいは所望のボールカインポリペプチドを合成することにより調製できる。当業者は、グリコシル化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などのアミノ酸変化がボールカインポリペプチドの翻訳後プロセスを変えうることを理解するであろう。

20

【0058】

天然完全長配列ボールカイン又はここに記載したボールカインの種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第5,364,934号に記載されている保存的及び非保存的変異についての技術及び指針の任意のものを用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列ボールカインと比較してボールカインのアミノ酸配列が変化するボールカインをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも一のアミノ酸のボールカインの一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。いずれのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、ボールカインの配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一つのアミノ酸の類似した構造及び/又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、すなわち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては約1から5のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列におけるアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的になし、得られた変異体を完全長又は成熟天然配列が示す活性について試験することにより決定される。

30

【0059】

ボールカインポリペプチド断片がここに提供される。このような断片は、例えば、完全長天然タンパク質と比較した際に、N-末端又はC-末端で切断されてもよく、又は内部残基を欠いていてもよい。ある種の断片は、ボールカインポリペプチドの所望の生物学的活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

40

ボールカイン断片は、多くの一般的な技術の任意のものによって調製することができる。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法是、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基によって決定される部位のタンパク質を切断することが知られた酵素でタンパク質を処理することにより、あるいは適当な制限酵素でDNAを消化して所望の断片を単離することによるボールカイン断片の生成を含む。さらに他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、所望のポリペプチド断片をコードするDNA断片を単離し増幅することを含む。DNA断片の所望の末端を決定するオリゴヌクレオチドは、PCRの5'及び3'プライマーで用いられる。好ましくは、ボールカインポリペプチド断片は

50

、ここに開示した天然ボールカインポリペプチドと少なくとも一つの生物学的及び/又は免疫学的活性を共有する。

特定の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換と題した表6に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表6に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より実質的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

【0060】

【表6】

表6

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe;	
	ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val;	
	met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe;	
	ala; ノルロイシン	leu

10

20

30

【0061】

ボールカインポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の実質的な修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b)標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の高を維持しながら、それらの効果が有意に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づくグループに分けることができる：

(1) 疎水性：ノルロイシン, met, ala, val, leu, ile;

(2) 中性の親水性：cys, ser, thr;

(3) 酸性：asp, glu;

(4) 塩基性：asn, gln, his, lys, arg;

(5) 鎖配向に影響する残基：gly, pro; 及び

(6) 芳香族：trp, tyr, phe。

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、より好ましくは残された(非保存)部位に導入されうる。

【0062】

変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキャンニング

40

50

、及びPCR突然変異誘発のようなこの分野で知られた方法を用いてなすことができる。部位特異的突然変異誘発 [Carterら, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zollerら, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [Wellsら, Gene, 34: 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発 [Wellsら, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)]あるいは他の知られた技術をクローニングしたDNAに対して実施してボールカイン変異体DNAを製造することもできる。

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham及びWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的に好ましい。さらに、それは埋もれた位置と露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1(1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

【0063】

C. ボールカインの修飾

ボールカインポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一つのタイプは、ボールカインポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、ボールカインの選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応可能な有機誘導体化試薬と反応させることである。二官能性試薬での誘導体化は、例えば抗ボールカイン抗体の精製方法に使用される水不溶性支持体マトリクス又は表面にボールカインを架橋させるためあるいはその逆の場合に有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、1, 1'-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸とのエステル、3, 3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬を含む。

他の修飾は、グルタミル及びアスパラギン残基の各々対応するグルタミル及びアスパラギン残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の-N-アミノ基のメチル化 [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0064】

本発明の範囲内に含まれるボールカインポリペプチドの共有結合的修飾の他のタイプは、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、ここで意図されるのは、天然配列ボールカインに見られる一又は複数の炭水化物部分の欠失(存在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び/又は酵素的手段によるグリコシル化の削除のいずれかによる)、及び/又は天然配列ボールカインに存在しない1又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。さらに、この文節は、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含む。

ボールカインポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴ってもよい。この変更は、例えば、1又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列ボールカイン(O-結合グリコシル化部位)への付加、又は置換によってなされてもよい。ボールカインアミノ酸配列は、場合によっては、DNAレベルでの変化、特に、ボールカインポリペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることを通して変更されてもよい。

10

20

30

40

50

ボールカインポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。このような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に公開された国際公開87/05330、及びAplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

【0065】

ボールカインポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddinら, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)により、及びEdgeら, Anal. Biochem., 118: 131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakuraら, Meth. Enzymol. 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

ボールカインの共有結合的修飾の他のタイプは、ボールカインポリペプチドの、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つへの、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。

また、本発明のボールカインポリペプチドは、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したボールカインポリペプチドを含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。

【0066】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとボールカインポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的にはボールカインポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなボールカインのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってボールカインを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン(ポリ-his)又はポリ-ヒスチジン-グリシン(poly-his-gly)タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Fieldら, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evanら, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616(1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD) タグ及びその抗体 [Paborskyら, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hoppら, BioTechnology, 6:1204-1210(1988)]；KT3エピトープペプチド [Martinら, Science, 255:192-194 (1992)]；-チューブリンエピトープペプチド [Skinnerら, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuthら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397(1990)]を含む。

【0067】

別の実施態様では、キメラ分子はボールカインの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態(「イムノアドヘシン」とも呼ばれる)については、そのような融合体はIgG分子のFc領域であり得る。Ig融合体は、好ましくはIg分子内の少なくとも一つの可変領域に換えてボールカインポリペプチドの可溶化(膜貫通ドメイン欠失又は不活性化)形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、IgG1分子のヒンジ、CH2及びCH3、又はヒンジ、CH1、CH2及びCH3領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5,428,130号を参照のこと。

【0068】

D. ボールカインの調製

以下の説明は、主として、ボールカイン核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入され

10

20

30

40

50

た細胞を培養することによりボールカインを生産する方法に関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いてボールカインを調製することができると考えられる。例えば、ボールカイン配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい [例えば、Stewartら, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., サンフランシスコ, カリフォルニア(1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)参照]。マニュアル技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機(フォスター シティ, カリフォルニア)を用いて、製造者の指示により実施してもよい。ボールカインの種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的 method を用いて結合させて完全長ボールカインを生産してもよい。

10

【 0 0 6 9 】

1. ボールカインをコードする DNA の単離

ボールカインをコードする DNA は、ボールカイン mRNA を保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製された cDNA ライブラリから得ることができる。従って、ヒトボールカイン DNA は、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製された cDNA ライブラリから簡便に得ることができる。またボールカイン-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリから又は公知の合成方法(例えば、自動化核酸合成)により得ることもできる。

ライブラリは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ(ボールカインに対する抗体又は少なくとも約 20-80 塩基のオリゴヌクレオチド等)によってスクリーニングできる。選択されたプローブによる cDNA 又はゲノムライブラリのスクリーニングは、例えば Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。ボールカインをコードする遺伝子を単離する他の方法は PCR 法を使用するものである [Sambrookら, 上掲; Dieffenbachら, PCR Primer: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

20

【 0 0 7 0 】

下記の実施例には、cDNA ライブラリのスクリーニング技術を記載している。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、十分な長さで、疑陽性が最小化されるよう十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリ内の DNA とのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、³²P 標識された ATP のような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用が含まれる。中程度の厳密性及び高度の厳密性を含むハイブリダイゼーション条件は、上掲の Sambrookらに示されている。

30

このようなライブラリスクリーニング法において同定された配列は、GenBankなどの公的なデータベース又は私的な配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内又は全長に渡っての(アミノ酸又は核酸レベルのいずれかでの)配列同一性は、当該分野で知られた

40

、及びここに記載した方法を用いて決定することができる。タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、cDNA に逆転写されていない mRNA の生成中間体及び先駆物質を検出する上掲の Sambrookらに記述されているような従来のプライマー伸展法を使用して選択された cDNA 又はゲノムライブラリをスクリーニングすることによって得られる。

【 0 0 7 1 】

2. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したボールカイン生産のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列

50

をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler編 (IRL Press, 1991)及び上掲のSambrookらに見出すことができる。

【0072】

原核生物細胞形質移入及び真核生物細胞形質移入の方法、例えば、 $CaCl_2$ 、 $CaPO_4$ 、リボソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrookらに記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shawら, Gene, 23:315(1983)及び1989年6月29日公開の国際公開89/05859に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が好ましい。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingenら, J. Bact., 130:946 (1977)及びHsiaoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keownら, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)及びMansourら, Nature, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

【0073】

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294(ATCC31,446);大腸菌X1776(ATCC31,537);大腸菌株W3110(ATCC27,325)及びK5772(ATCC53,635)である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、E. coli、エンテロバクター、エルビニア(Erwinia)、クレブシエラ(Klebsiella)、プロテウス(Proteus)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチア・マルセサンス(Serratia marcescans)、及び赤痢菌などの腸内細菌科、並びに桿菌、例えばバチルス・サブチリス(B. subtilis)及びバチルス・リチェニフォルミス(B. licheniformis)(例えば、1989年4月12日発行のDD266,710に記載されたバチルス・リチェニフォルミス41P)、シュドモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスを含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生産物発酵のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110は、細胞に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異をするように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型tonAを有する大腸菌W3110株1A2;完全な遺伝子型tonA ptr3を有する大腸菌W3110株9E4;完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^rを有する大腸菌W3110株27C7(ATCC 55,244);完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^rを有する大腸菌W3110株37D6;非カナマイシン耐性degP欠失変異を持つ37D6株である大腸菌W3110株40B4;及び1990年8月7日発行の米国特許第4,946,783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラ

ーゼ反応が好ましい。

【0074】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、ボールカインコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシヤは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日公開の欧州特許第139,383号); クルベロミセス宿主(*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4,943,529号; Fleerら, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991))、例えばクルベロミセスラクチス(*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourtら, *J. Bacteriol.* 154(2): 737-742 [1983])、クルベロミセス・フラギリリス(*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、クルベロミセス・ブルガリクス(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、クルベロミセス・ウイケラミイ(*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、クルベロミセス・ワルチイ(*K. waltii*) (ATCC 56,500)、クルベロミセス・ドロソフィラルム(*K. drosophilum*) (ATCC 36,906; Van den Bergら, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990))、クルベロミセス・テモトレランス(*K. thermotolerans*)及びクルベロミセス・マルキシヤナス(*K. marxianus*); ヤロウイア(*Yarrowia*) (欧州特許第402,226号); ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*) (欧州特許第183,070号; Sreekrishnaら, *J. Basic Microbiol.* 28: 265-278 [1988]); カンジダ; トリコデルマ・レーシア(*Trichoderma reesia*) (欧州特許第244,234号); アカパンカピ (Caseら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979]); シュワニオマイセス(*Schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセス・オクシデンタリス(*Schwanniomyces occidentalis*) (1990年10月31日公開の欧州特許第394,538号); 及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(*Tolyposcladium*) (1991年1月10日公開の国際公開91/00357); 及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルスニダランス (Ballanceら, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112: 284-289 [1983]; Tilburnら, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yeltonら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) 及びアスペルギルスニガー (Kelly及びHynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985]) が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(C1化合物資化性、Methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(*Hansenula*)、カンジダ、クロエケラ(*Kloeckera*)、ピチア(*Pichia*)、サッカロミセス、トルロプシス(*Torulopsis*)、及びロドトルラ(*Rhodotorula*)からなる属から選択されたメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982)に記載されている。

【0075】

グリコシル化ボールカインの発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエS2及びスポドプテラSf9のような昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)及びCOS細胞を含む。より詳細な例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞, Grahamら, *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHF R(CHO, Urlaub及びChasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)) ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065); 及びマウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL 51)を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

【0076】

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

ボールカインをコードする核酸(例えば、cDNA又はゲノムDNA)は、クローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが

公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

ボールカインは直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるボールカイン-コード化DNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択された原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(サッカロミセス(*Saccharomyces*)及びクレイベロマイシス(*Kluyveromyces*) 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(*C.albicans*)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日公開の欧州特許第362179号)、又は1990年11月15日に公開された国際公開90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【0077】

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 μ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)例えばバシリのD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子のような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

【0078】

哺乳動物細胞に適切な選べるマーカーの例は、DHFRあるいはチミジンキナーゼのようにボールカイン-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaubらにより Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたDHFR活性に欠陥のあるCHO株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である[Stinchcombら, Nature, 282:39(1979); Kingsmanら, Gene, 7:141(1979); Tschemperら, Gene, 10:157(1980)]。trp1遺伝子は、例えば、ATCC番号44076あるいはPEP4-1のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する[Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

発現及びクローニングベクターは、通常、ボールカイン-コード化核酸配列に作用可能に結合し、mRNA合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識される好適なプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 [Changら, Nature, 275:615 (1978);

Goeddelら, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリフォスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776]、及びハイブリッドプロモーター、例えば tac プロモーター [deBoerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)] を含む。細菌系で使用するプロモーターもまたボールカインをコードする DNA と作用可能に結合したシャイン-ダルガーノ (S.D.) 配列を有する。

【0079】

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ [Hitzeman ら, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 又は他の糖分解酵素 [Hess ら, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900(1978)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸フォスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは欧州特許第73,657号に更に記載されている。

【0080】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのボールカイン転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス(1989年7月5日公開のUK2,211,504)、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及びサルウイルス40(SV40)のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

より高等の真核生物による所望のボールカインをコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス作用要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、ボールカインコード化配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

【0081】

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウイルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、ボールカインをコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養でのボールカインの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gethingら, Nature, 293:620-625 (1981); Manteiら, Nature, 281:40-46 (1979); 欧州特許第117,060号; 及び欧州特許第117,058号に記載されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 2 】

4 . 遺伝子増幅 / 発現の検出

遺伝子の増幅及び / 又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンプロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンプロット法 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、ドットプロット法 (DNA分析)、又はインサイツハイブリダイゼーション法によって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。次いで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果二本鎖の表面での形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

10

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び / 又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列ボールカインポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はボールカインDNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

【 0 0 8 3 】

5 . ポリペプチドの精製

ボールカインの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液 (例えばトリトン-X100) 又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。ボールカインの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

20

ボールカインを、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAEによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過；IgGのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラム；及びボールカインのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, Methods in Enzymology, 182(1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定のボールカインの性質に依存する。

30

【 0 0 8 4 】

E . ボールカインの用途

ボールカインをコードする核酸配列 (又はそれらの相補鎖) は、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用を含む分子生物学の分野において、染色体及び遺伝子マッピングにおいて、及びアンチセンスRNA及びDNAの生成において種々の用途を有している。また、ボールカイン核酸も、ここに記載される組換え技術によるボールカインポリペプチドの調製に有用である。

40

【 0 0 8 5 】

完全長天然配列ボールカイン遺伝子又はその一部は、全長ボールカインcDNAの単離又はここに開示した天然ボールカイン配列に対して所望の配列同一性を持つ更に他のcDNA (例えば、ボールカインの天然発生変異体又は他の種からのボールカインをコードするもの) の単離のためのcDNAライブラリ用のハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。場合によっては、プローブの長さは約20~約50塩基である。ハイブリダイゼーションプローブは、少なくとも部分的に完全長天然ヌクレオチド配列の新規な領域か

50

ら誘導してもよく、それらの領域は、過度の実験をすることなく、天然配列ボールカインのプロモーター、エンハンサー成分及びイントロンを含むゲノム配列から誘導され得る。例えば、スクリーニング法は、ボールカイン遺伝子のコード化領域を周知のDNA配列を用いて単離して約40塩基の選択されたプローブを合成することを含む。ハイブリダイゼーションプローブは、³²P又は³⁵S等の放射性ヌクレオチド、又はアビジン/ビオチン結合系を介してプローブに結合したアルカリホスファターゼ等の酵素標識を含む種々の標識で標識されうる。本発明のボールカイン遺伝子に相補的な配列を有する標識されたプローブは、ヒトcDNA、ゲノムDNA又はmRNAのライブラリをスクリーニングし、そのライブラリの何れのメンバーがプローブにハイブリダイズするかを決定するのに使用できる。ハイブリダイゼーション技術は、以下の実施例において更に詳細に記載する。

10

【0086】

本出願で開示する任意のESTは、同様に、ここに記載した方法を用いてプローブとして用いることができる。

ボールカイン核酸の他の有用な断片は、標的ボールカイン mRNA (センス) 又はボールカイン DNA (アンチセンス) 配列に結合できる一本鎖核酸配列 (RNA 又は DNA のいずれか) を含むアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを含む。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、本発明によると、ボールカイン DNA のコード化領域の断片を含む。このような断片は、一般的には少なくとも約14ヌクレオチド、好ましくは約14から30ヌクレオチドを含む。与えられたタンパク質をコードするcDNA配列に基づく、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを制御する可能性は、例えば、Stein及びCohen (Cancer Res. 48: 2659: [1988]) 及び van der Krolら, (BioTechniques 6: 958, [1988]) に記載されている。

20

【0087】

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成をもたらし、それは、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の期外停止を含む幾つかの方法の一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ボールカインタンパク質の発現を阻止するのに用いられる。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖-ホスホジエステル骨格 (又は他の糖結合、国際公開91/06629に記載のもの等) を有するオリゴヌクレオチドをさらに含み、そのような糖結合は内因性ヌクレアーゼ耐性である。そのような耐性糖結合を持つオリゴヌクレオチドは、インビボで安定であるが (すなわち、酵素分解に耐えうるが)、標的ヌクレオチド配列に結合できる配列特異性は保持している。

30

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、国際公開90/10048に記載されているもののような、有機部分、及びオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への親和性を向上させる他の部分、例えばポリ-(L-リジン) に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。さらにまた、エリプチシン等の挿入剤、アルキル化剤又は金属錯体をセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合させ、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的ヌクレオチド配列への結合特異性を改変してもよい。

【0088】

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、CaPO₄-媒介DNA形質移入、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子転換方法により、又はエプスタイン-バーウイルスなどの遺伝子転換ベクターを用いることにより、標的核酸配列を含む細胞に導入される。好ましい方法では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞は、インビボ又はエキソビボで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。好適なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルスM-MuLVから誘導されるもの、N2 (M-MuLVから誘導されたレトロウイルス)、又はDCT5A、DCT5B及びDCT5Cと命名されたダブルコピーベクター (国際公開90/13641参照) を含む。

40

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開91/04753に記載されているように、リガンド結合分子との複合体の形成により標的配列を含む細胞に導入

50

してもよい。適切なリガンド結合分子は、これらに限られないが、細胞表面レセプター、成長因子、他のサイトカイン、又は細胞表面レセプターに結合する他のリガンドを含む。好ましくは、リガンド結合分子の複合体形成は、リガンド結合分子がその対応する分子又はレセプターに結合する、あるいはセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその複合体の細胞への侵入を阻止する能力を実質的に阻害しない。

【0089】

あるいは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開90/10448に記載されたように、オリゴヌクレオチド-脂質複合体の形成により標的核酸配列を含む細胞に導入してもよい。センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド-脂質複合体は、好ましくは内因性リパーゼにより細胞内で分解される。

アンチセンス又はセンスRNA又はDNA分子は一般に少なくとも約5塩基長、約10塩基長、約15塩基長、約20塩基長、約25塩基長、約30塩基長、約35塩基長、約40塩基長、約45塩基長、約50塩基長、約55塩基長、約60塩基長、約65塩基長、約70塩基長、約75塩基長、約80塩基長、約85塩基長、約90塩基長、約95塩基長、約100塩基長、あるいはそれよりも長い。

また、プローブは、PCR技術に用いて、密接に関連したボールカインコード化配列の同定のための配列のプールを作成することができる。

また、ボールカインをコードするヌクレオチド配列は、そのボールカインをコードする遺伝子のマッピングのため、及び遺伝子疾患を持つ個体の遺伝子分析のためのハイブリダイゼーションプローブの作成にも用いることができる。ここに提供されるヌクレオチド配列は、インサイツハイブリダイゼーション、既知の染色体マーカーに対する結合分析、及びライブラリでのハイブリダイゼーションスクリーニング等の周知の技術を用いて、染色体及び染色体の特定領域にマッピングすることができる。

【0090】

ボールカインのコード化配列が他のタンパク質に結合するタンパク質をコードする場合（例えば、ボールカインがレセプターである場合）、ボールカインは、結合相互作用に参与している他のタンパク質又は分子を同定するためのアッセイに用いることができる。このような方法により、レセプター/リガンド結合性相互作用の阻害剤を同定することができる。このような結合性相互作用に含まれるタンパク質も、ペプチド又は小分子阻害剤又は結合性相互作用のアゴニストのスクリーニングに用いることができる。また、レセプターボールカインは関連するリガンドの単離にも使用できる。スクリーニングアッセイは、天然ボールカイン又はボールカインのレセプターの生物学的活性に似たリード化合物の発見のために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングにも用いられ、小分子候補薬剤の同定に特に適したものとする。考慮される小分子は、合成有機又は無機化合物を含む。アッセイは、この分野で良く特徴付けられているタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。

【0091】

また、ボールカイン又はその修飾型をコードする核酸は、トランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物のいずれかを産生することに使用でき、これらは治療的に有用な試薬の開発やスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物(例えばマウス又はラット)とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれたDNAである。一実施形態では、ボールカインをコードするcDNAは、ボールカインをコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用するゲノム配列及び確立された技術に基づいて、ボールカインをコードするゲノムDNAをクローン化するために使用することができる。トランスジェニック動物、特にマウス又はラット等の特定の動物を産生する方法は、当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第4,736,866号や第4,870,009号に記述されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサーでのボールカイン

10

20

30

40

50

導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入されたボールカインコード化導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物はボールカインをコードするDNAの増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理学的状態に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスター動物として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病理学的状態の発症率が低ければ、病理学的状態に対する治療上の処置の可能性が示される。

【0092】

あるいは、ボールカインの非ヒト相同体は、動物の胚幹細胞に導入されたボールカインをコードする変更ゲノムDNAと、ボールカインをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、ボールカインをコードする欠陥又は変更遺伝子を有するボールカイン「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、ボールカインをコードするcDNAは、確立された技術に従い、ボールカインをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。ボールカインをコードするゲノムDNAの一部を欠失したり、組み込みを監視するために使用する選択可能なマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングDNA(5'と3'末端の両方)を数千ベース含む[例えば、相同的組換えベクターについてはThomas及びCapocchi, Cell, 51:503(1987)を参照のこと]。ベクターは胚幹細胞に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞が選択された[例えば、Liら, Cell, 69:915(1992)参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照のこと]。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間において「ノックアウト」動物を作り出す。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、例えば、ボールカインポリペプチドの欠乏によるある種の病理学的状態及びその病理学的状態の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

【0093】

また、ボールカインポリペプチドをコードする核酸は遺伝子治療にも使用できる。遺伝子治療用途においては、例えば欠陥遺伝子を置換するため、治療的有効量の遺伝子産物のインビボ合成を達成するために遺伝子が導入される。「遺伝子治療」とは、1回の処理により継続的効果が達成される従来の遺伝子治療と、治療的に有効なDNA又はmRNAの1回又は繰り返し投与を含む遺伝子治療薬の投与の両方を含む。アンチセンスRNA及びDNAは、ある種の遺伝子のインビボ発現を阻止する治療薬として用いることができる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞膜による制限された取り込みに起因する低い細胞内濃度にもかかわらず、それが阻害剤として作用する細胞中に移入できることは既に示されている(Zamecnikら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4143-4146 [1986])。オリゴヌクレオチドは、それらの負に荷電したリン酸ジエステル基を非荷電基で置換することによって取り込みを促進するように修飾してもよい。

【0094】

生存可能な細胞に核酸を導入するための種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が培養細胞にインビトロで、あるいは意図する宿主の細胞においてインビボで移入されるかに応じて変わる。核酸を哺乳動物細胞にインビトロで移入するのに適した方法は、リボソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などを含む。現在好ましいインビボ遺伝子移入技術は、ウイルス(典型的にはレトロウイルス)ベクターでの形質移入及びウイルス被覆タンパク質-リボソーム媒介形質移入である(Dzauら, Trends in Biotechnology 11, 205-210(1993))。幾つかの状況では、核酸供給源を、細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンド等の標的細胞を標的化する薬剤とともに

に提供するのが望ましい。リポソームを用いる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクルにおいて内部移行を受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし細胞内半減期を向上させるタンパク質が、標的化及び/又は取り込みの促進のために用いられる。レセプター媒介エンドサイトーシスは、例えば、Wuら, *J. Biol. Chem.* 262, 4429-4432 (1987); 及びWagnerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3410-3414 (1990)によって記述されている。遺伝子作成及び遺伝子治療のプロトコールの概説については、Andersonら, *Science* 256, 808-813 (1992)を参照のこと。

【0095】

ここに記載したボールカインポリペプチドをタンパク質電気泳動目的の分子量マーカーとして用いてもよく、単離された核酸配列を、これらのマーカーを組み換え発現に用いてもよい。

ここに記載したボールカインポリペプチド又はその断片をコードする核酸分子は、染色体の同定に有用である。この点において、実際の配列に基づく染色体マーキング試薬は殆ど利用可能ではないため、新規な染色体マーカーの同定が必要である。本発明の各ボールカイン核酸分子は染色体マーカーとして使用できる。

また、本発明のボールカインポリペプチド及び核酸分子は組織タイピングに使用でき、本発明のボールカインポリペプチドは、好ましくは同じ型の正常組織と比較して疾患性組織において、一方の組織で他方に比較して異なる発現をする。ボールカイン核酸分子には、PCR、ノーザン分析、サザン分析及びウェスタン分析のプローブ生成のための用途が見出されるであろう。

【0096】

ここに記載したボールカインポリペプチドは治療薬として用いてもよい。本発明のボールカインポリペプチドは、製薬的に有用な組成物を調製するのに知られた方法に従って製剤され、これにより、このボールカイン生成物は製薬的に許容される担体媒体と混合される。治療用製剤は、凍結乾燥された製剤又は水性溶液の形態で、任意的な製薬上許容可能なキャリア、賦形剤又は安定剤と、所望の精製度を有する活性成分とを混合することにより (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed., [1980])、調製され保管される。許容される担体、賦形剤又は安定剤は、用いる投与量及び濃度ではレシピエントに対して無毒性であり、リン酸、クエン酸及び他の有機酸等の緩衝液; アスコルビン酸を含む抗酸化剤; 低分子量(残基数10個未満)ポリペプチド; 血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン等のタンパク質; ポリビニルピロリドン等の親水性重合体; グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸; グルコース、マンノース又はデキストリン等の単糖類、二糖類又は他の炭水化物; EDTA等のキレート剤、マンニトール又はソルビトール等の糖類; ナトリウム等の塩形成対イオン; 及び/又は TWEENTM、PLURONICSTM 又はPEG等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0097】

インビボ投与に使用される製剤は滅菌されていなくてはならない。これは、凍結乾燥及び再構成の前又は後に、滅菌フィルター膜を通す濾過により容易に達成される。

ここで、本発明の製薬組成物は一般に、無菌のアクセスポートを具備する容器、例えば、皮下注射針で貫通可能なストッパーを持つ静脈内バッグ又はバイアル内に配される。

投与経路は周知の方法、例えば、静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内又は病巣内経路での注射又は注入、局所投与、又は徐放系による。

本発明の製薬組成物の用量及び望ましい薬物濃度は、意図する特定の用途に応じて変化する。適切な用量又は投与経路の決定は、通常の内科医の技量の範囲内である。動物実験は、ヒト治療のための有効量の決定についての信頼できるガイダンスを提供する。有効量の種間スケールリングは、*Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobiら, 編, Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96のMordenti, J. 及びChappell, W. 「The use of interspecies scaling in toxicokinetics」に記載された原理に従って実施できる。

【0098】

10

20

30

40

50

ボールカインポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストのインビボ投与が用いられる場合、正常な投与量は、投与経路に応じて、哺乳動物の体重当たり1日に約10 ng/kgから100 mg/kgまで、好ましくは約1 µg/kg/日から10 mg/kg/日である。特定の用量及び輸送方法の指針は文献に与えられている；例えば、米国特許第4,657,760号、第5,206,344号、又は第5,225,212号参照。異なる製剤が異なる治療用化合物及び異なる疾患に有効であること、例えば一つの器官又は組織を標的とする投与には、他の器官又は組織とは異なる方式で輸送することが必要であることが予想される。

ボールカインポリペプチドの投与を必要とする任意の疾患又は疾病の治療に適した放出特性を持つ製剤でボールカインポリペプチドの持続放出が望まれる場合、ボールカインポリペプチドのマイクロカプセル化が考えられる。持続放出のための組換えタンパク質のマイクロカプセル化は、ヒト成長ホルモン(rhGH)、インターフェロン-(rhIFN-)、インターロイキン-2、及びMN rgp120で成功裏に実施されている。Johnsonら, Nat. Med., 2: 795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27: 1221-1223 (1993); Horaら, Bio/Technology, 8: 755-758 (1990); Cleland, 「Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems」 Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell 及び Newman編, (Plenum Press: New York, 1995), p.439-462; 国際公開97/03692, 国際公開96/40072, 国際公開96/07399; 及び米国特許第5,654,010号。

【0099】

これらのタンパク質の持続放出製剤は、ポリ-乳酸-コグリコール酸(PLGA)ポリマーを用い、その生体適合性及び広範囲の生分解特性に基づいて開発された。PLGAの分解生成物である乳酸及びグリコール酸は、ヒト身体内で即座にクリアされる。さらに、このポリマーの分解性は、分子量及び組成に依存して数ヶ月から数年まで調節できる。Lewis, 「Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer」: M. C hasin及び R. Langer (編), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41。

本発明は、ボールカインポリペプチドに類似する(アゴニスト)又はボールカインポリペプチドの効果を阻害する(アンタゴニスト)ものを同定するための化合物のスクリーニング方法も包含する。アンタゴニスト候補薬のスクリーニングアッセイは、ここに同定した遺伝子にコードされるボールカインポリペプチドと結合又は複合体形成する化合物、又は他にコード化ポリペプチドの他の細胞性タンパク質との相互作用を阻害する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、それを特に小分子候補薬の同定に適したものにす、化学的ライブラリのハイスループットスクリーニングに適用可能なアッセイを含む。

該アッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ、及び細胞ベースのアッセイで、この分野で知られたものを含む種々の方式で実施される。

アンタゴニストについての全てのアッセイは、それらが候補薬をここで同定された核酸にコードされるボールカインポリペプチドと、これら2つの成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間で接触させることを必要とすることにおいて共通する。

【0100】

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特定の実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるボールカインポリペプチド又は候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をボールカインポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化されるボールカインポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、それを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加するこ

とにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体によって検出できる。

【0101】

候補化合物が相互作用するがここに同定した遺伝子にコードされる特定のボールカインポリペプチドに結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られている方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィーカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Chevray及びNathans [Proc.Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)] に開示されているように、Fields及び共同研究者ら [Fields及びSong, Nature(London) 340, 245-246 (1989); Chienら, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991)] に記載された酵母ベースの遺伝子系を用いることによってモニターすることができる。酵母GAL4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。前出の文献に記載された酵母発現系(一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる)は、この特性の長所を利用し、並びに2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-1lacZリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、 β -ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット(MATCHMAKER(商品名))は、Clontechから商業的に入手可能である。また、この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこれら相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定へ拡大適用することができる。

ここで同定されたボールカインポリペプチドをコードする遺伝子と細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験できる：通常、反応混合物は、遺伝子産物と細胞外又は細胞内成分を、これら2つの生成物の相互作用及び結合が可能な条件下及び時間に渡って含むように調製される。候補化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。さらに、ブラシーボを第3の反応混合物に添加してポジティブコントロールを提供してもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は細胞外成分との結合(複合体形成)は上記のようにモニターされる。試験化合物を含有する反応混合物ではなく、コントロール反応における複合体の形成は、試験化合物が試験化合物とその結合パートナーとの相互作用を阻害することを示す。

【0102】

アンタゴニストをアッセイするためには、特定の活性についてスクリーニングされる化合物とともにボールカインポリペプチドを細胞へ添加してもよく、ボールカインポリペプチド存在下における対象活性を阻害する化合物の能力は、化合物がボールカインポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、ボールカインポリペプチドと膜結合ボールカインポリペプチドレセプター又は組換えレセプターを有する潜在的アンタゴニストを競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることによって、アンタゴニストを検出してよい。放射活性などでボールカインポリペプチドを標識することが可能であり、潜在的アンタゴニストの有効性を判断するためにレセプターに結合したボールカインポリペプチドの数を利用することができる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパンニング及びFACSソートによって同定できる。Coliganら, Current Protocols in Immun., 1(2): 第5章(1991)。好ましくは、発現クローニングが用いられ、ポリアデニル化RNAがボールカインポリペプチドに反応性の細胞から調製

10

20

30

40

50

され、このRNAから生成されたcDNAライブラリがプールに分配され、COS細胞又はボールカインポリペプチドに対して反応性ではない他の細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を、標識したボールカインポリペプチドで暴露する。このボールカインポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の封入を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフィ分析を施す。ポジティブプールを同定し、相互作用サブプール化及び再スクリーニング工程を用いてサブプールを調製して再形質移入し、最終的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

【0103】

レセプター同定の代替的方法として、標識ボールカインポリペプチドをレセプター分子を
10
発現する細胞膜又は抽出調製物に光親和性結合させることができる。架橋材料をPAGE
で溶解させ、X線フィルムへ暴露する。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチド
断片へ分解し、タンパク質マイクロ配列決定を施すことができる。マイクロ配列決定から
得たアミノ酸配列は、推定レセプターをコードする遺伝子を同定するcDNAライブラリ
をスクリーニングする縮重オリゴヌクレオチドプローブの一組の設計に用いられる。

アンタゴニストの他のアッセイでは、レセプターを発現する哺乳動物細胞又は膜調製物を、
候補化合物の存在下で標識ボールカインポリペプチドとともにインキュベートする。次
いで、この相互作用を促進又は阻止する化合物の能力を測定する。

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンとボールカインポリペプチド
との融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリ-及びモノクロー
20
ナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断
片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。ある
いは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識
するが効果を与えず、従ってボールカインポリペプチドの作用を競合的に障害するボー
ルカインポリペプチドの変異形態であってもよい。

【0104】

他の潜在的なボールカインポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調
製されたアンチセンスRNA又はDNA作成物であり、例えば、アンチセンスRNA又は
DNA分子は、標的mRNAにハイブリダイズしてタンパク質翻訳を妨害することにより
mRNAの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、トリプルヘリックス
30
形成又はアンチセンスDNA又はRNAを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、
それらの方法はともに、ポリヌクレオチドのDNA又はRNAへの結合に基づく。例えば
、ここでの成熟ボールカインポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コー
ド化部分は、約10から40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドの設計に
使用される。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的である
ように設計され(トリプルヘリックス - Leeら, Nucl. Acid Res., 6: 3073 (1979); Coon
eyら, Science, 241: 456 (1988); Dervanら, Science, 251: 1360 (1991)参照)、それ
によりボールカインポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンスRNAオリゴ
ヌクレオチドはインピボでmRNAにハイブリダイズしてmRNA分子のボールカインポリ
ペプチドへの翻訳を阻止する(アンチセンス - Okano, Neurochem., 56: 560 (1991);
40
ligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca
Raton, FL, 1988))。上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に輸送され、アンチセンスR
NA又はDNAをインピボで発現させて、ボールカインポリペプチドの生産を障害するこ
ともできる。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌ
クレオチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオ
チドが好ましい。

【0105】

潜在的アンタゴニストは、ボールカインポリペプチドの活性部位、レセプター結合部位、
又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それによりボールカインポリペプチドの正
常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型
50

ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチジル有機又は無機化合物を含む。

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリダイゼーション、ついで内ヌクレオチド結合分解性切断により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、上掲のRossi, *Current Biology* 4:469-471 (1994)及びPCT公報番号、国際公開97/33551(1997年9月18日公開)を参照。

【0106】

転写阻害に用いられるトリプルヘリックス形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介するトリプルヘリックス形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。さらなる詳細は、例えば、PCT公報番号、国際公開97/33551、上掲を参照。

これらの小分子は、上記で検討したスクリーニングアッセイの一又は複数の任意のものにより及び/又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。また、ここで開示されている分子の診断的及び治療的利用は、下記に開示及び記載のポジティブ機能アッセイヒットに基づいている。

【0107】

ボールカインのようなELRモチーフを欠くケモカインはアンジオスタティックであるので(Strieter RM.ら *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 27348-27357)、ボールカインは腫瘍成長に付随する新血管形成を阻害することによって腫瘍を治療するのに有用であろう。単独で又は抗VEGFのような他のアンジオスタティック因子と組み合わせるとボールカインポリペプチドを投与すると腫瘍成長を制限し又は低減するのに有用であることが判明するであろう。

ケモカインは、CXCKケモカインによる好中球の活性化が示されているので(Baggioliniら *Adv Immunology* 1994; 55:97-179)、免疫細胞を活性化することができ、また非CXCKケモカインは主としてTリンパ球に対して化学走性である。ボールカインは、そのポリペプチドを局所投与すると感染部位に既に存在している免疫細胞を刺激し、より多くの免疫細胞を誘導してその部位に移動させ、より速い速度で感染を取り除くので感染の治療に有用であろう。

【0108】

F. 抗ボールカイン抗体

本発明はさらに抗ボールカイン抗体を提供する。例示的な抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロ結合体抗体が含まれる。

1. ポリクローナル抗体

抗ボールカイン抗体はポリクローナル抗体を含む。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫化剤、及び所望するのであればアジュバントを、一又は複数回注射することで産生させることができる。典型的には、免疫化剤及び/又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫化剤は、ボールカインポリペプチド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫化剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に結合させるのが有用である。このような免疫原タンパク質の例は、これらに限られないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びMPL-TDMアジュバント(モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコラート)が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

【0109】

2. モノクローナル抗体

10

20

30

40

50

あるいは、抗ボールカイン抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature, 256:495 (1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用することで調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫化剤により免疫化することで、免疫化剤に特異的に結合する抗体を生成するかあるいは生成可能なリンパ球を誘発する。また、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。

免疫化剤は、典型的にはボールカインポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「PBLs」)が使用され、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髄腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培養培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠いていると、ハイブリドーマの培養培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプチリン及びチミジンを含み(「HAT培地」)、この物質がHGPRT欠乏性細胞の増殖を阻止する。

【0110】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現をサポートし、HAT培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髄腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやバージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒト異種骨髄腫株化細胞も記載されている[Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]。

ついでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、ボールカインに対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(RIA)や酵素結合免疫測定法(ELISA)等のインビトロ結合アッセイによって測定される。このような技術及びアッセイは、当該分野において既知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキャッチャード分析法によって測定することができる。

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法で成長させることができる[Goding, 上掲]。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地及びRPMI-1640培地が含まれる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として成長させることもできる。

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製方法によって培養培地又は腹水液から単離又は精製される。

【0111】

また、モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作製することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常套的な方法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる

10

20

30

40

50

。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に組込むことができ、これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髄腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより[米国特許第4,816,567号; Morrison等, 上掲]、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

10

【0112】

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られてる。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するようにFc領域の任意の点で切断される。あるいは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。一価抗体の調製にはインビトロ法がまた適している。抗体の断片、特にFab断片を生成するための抗体の消化は、当該分野において知られている定法的技術を使用して達成できる。

【0113】

3. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗ポールカイン抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片(例えばFv、Fab、Fab'、(Fab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる[Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]。

20

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりWinter及び共同研究者[Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536 (1988)]の方法に従って実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

30

40

【0114】

また、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリ[Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks等, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]を含むこの分野で

50

知られた種々の方法を用いて作成することもできる。また、Cole等及びBoerner等の技術も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる(Cole等, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss. p.77(1985); Boerner等, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95(1991)]。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化してマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,661,016号、及び次の科学文献: Marks等, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg等, *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild等, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995)に記載されている。

また、抗体は上述した既知の選択及び/又は突然変異誘発法を使用し、親和成熟させてもよい。好ましい親和成熟抗体は、成熟抗体が調製された(一般的にマウス、ヒト化又はヒトの)出発抗体のものよりも、5倍、より好ましくは10倍、さらに好ましくは20又は30倍の親和性を有する。

【0115】

4. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。この場合、結合特異性の一方はボールカインに対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の共発現に基づく[Milstein及びCuello, *Nature*, 305:537-539(1983)]。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のWO 93/08829、及びTraunecker等, *EMBO J* 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、CH2及びCH3領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインと行われる。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)が有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするDNA、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作成するための更なる詳細については、例えばSuresh等, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照されたい。

【0116】

WO 96/27011に記載された他のアプローチによれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収される異種二量体の割合を最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのCH3領域の少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」は、大きなアミノ酸側鎖が小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えられた第2の抗体分子の界面に作り出される。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片(例えば、F(ab')₂ 二重特異性抗体)として調製できる。抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。

例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, *Science*, 229:81 (1985)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたF a b'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。F a b'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF a b'-チオールに再転換し、他のF a b'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。大腸菌からF a b'断片を直接回収でき、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体F(a b')₂分子の製造を記述している。各F a b'断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、Er b B 2レセプターを過剰発現する細胞及び正常なヒトT細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

10

20

30

40

50

【0117】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し単離する様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロインジッパーを使用して生産されている。Kostelnyら, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992)。F o s及びJ u nタンパク質からのロインジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なる抗体のF a b'部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollingerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。従って、一つの断片のV_H及びV_Lドメインは他の断片の相補的V_L及びV_Hドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖F v(s F v)ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruberら, *J. Immunol.* 152:5368 (1994)を参照されたい。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttら *J. Immunol.* 147:60(1991)。

例示的な二重特異性抗体は、ここに与えられたボールカインポリペプチドの2つの異なるエピトープに結合しうる。あるいは、抗ボールカインポリペプチドアームは、特定のボールカインポリペプチド発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、T細胞レセプター分子(例えばC D 2、C D 3、C D 2 8、又はB 7)等の白血球上のトリガー分子又はF c R I(C D 6 4)、F c R I I(C D 3 2)及びF c R I I I(C D 1 6)等のI g G(F c R)に対するF cレセプターに結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体は特定のボールカインポリペプチドを発現する細胞に細胞障害薬を局在化させるためにも使用されうる。これらの抗体はボールカイン-結合アーム及び細胞障害薬又は放射性キレート化剤、例えばE O T U B E、D P T A、D O T A、又はT E T Aと結合するアームを有する。対象の他の二重特異性抗体はボールカインポリペプチドに結合し、そしてさらに組織因子(T F)に結合する。

【0118】

5. ヘテロ結合体抗体

ヘテロ結合抗体も本発明の範囲内に入る。ヘテロ結合抗体は2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため[米国特許第4,676,980号]及びH I V感染の治療のために[W O 91/00360; W O 92/200373; EP 03089]提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられ

る。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されているものが含まれる。

【0119】

6. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌の治療における抗体の有効性を向上させるのが望ましい。例えば、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させるようにしてもよい。そのようにして生成されたホモダイマー抗体は、向上した内部移行能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存性細胞性細胞毒性(ADCC)を有しうる。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つホモダイマー抗体は、Wolff等, Cancer research 53: 2560-2565 (1993)に記載されたような異種二官能性架橋を用いても調製しうる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。

10

【0120】

7. 免疫結合体

本発明はまた、化学療法剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)などの細胞障害薬、あるいは放射性同位体(即ち、放射性結合)に結合

20

された抗体を含む免疫複合体にも関する。このような免疫結合体の生成に有用な化学療法剤は上記した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリアトキシンの非結合活性断片、(緑膿菌からの)エクソトキシンA鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、ヨウシュヤマゴボウタンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、ツルレイシインヒビター、クルシン、クロチン、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)を含む。様々な放射性ヌクレオチドが放射性結合抗体の生成に利用可能である。例として、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y及び¹⁸⁶Reを含む。

30

抗体及び細胞障害薬の結合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238: 1098 (1987)に記載されたように調製することができる。カーボン-14-標識

40

1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体への結合のためのキレート剤の例である。WO 94/11026参照。

他の実施態様では、腫瘍の予備標的化で使用するために、抗体は「レセプター」(ストレプトアビジン等)に結合されてもよく、抗体-レセプター結合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合結合体を循環から除去し、次に細胞障害薬(放射性ヌクレオチド等)に結合された「リガンド」(アビジン等)を投与する。

【0121】

8. 免疫リポソーム

また、ここに開示するタンパク質、抗体は、免疫リポソームとして調製してもよい。抗体

50

を含むリポソームは、Epstein等, Proc. Natl. acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第4,485,045号及び同第4,544,545号に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、定められた孔サイズのフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体のFab'断片は、Martin等, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに結合され得る。化学療法剤(ドキシソルピシン等)は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizon等, J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989)参照。

10

【0122】

9. 抗体の製薬組成物

ここで同定されたボールカインポリペプチドに特異的に結合する抗体、並びに上記に開示したスクリーニングアッセイによって同定された他の分子は、種々の疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

ボールカインポリペプチドが細胞内にあり、全抗体が阻害剤として用いられる場合、取り込める抗体が好ましい。しかし、リポフェクション又はリポソームも抗体、又は抗体断片を細胞に導入するために使用できる。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、又は組換えDNA技術によって生成できる。例えば、Marascoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)参照。ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に1つ以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、細胞毒性薬、サイトカイン又は成長阻害剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

20

【0123】

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は上掲のRemington's Pharmaceutical Science に開示されている。

30

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例は、ポリエステルヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール))、ポリアクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸及びD-エチル-L-グルタメート、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商品名)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュプロリドの注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは37°Cの水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通した分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はス

40

50

ルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

【0124】

G. 抗ボールカイン抗体の用途

本発明の抗ボールカイン抗体は様々な有用性を有している。例えば、抗ボールカイン抗体は、ボールカインの診断アッセイ、例えばその特定細胞、組織、又は血清での発現の検出に用いられる。競合的結合アッセイ、直接又は間接サンドウィッチアッセイ及び不均一又は均一相で行われる免疫沈降アッセイ [Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158] 等のこの分野で知られた種々の診断アッセイ技術が使用される。診断アッセイで用いられる抗体は、検出可能な部位で標識される。検出可能な部位は、直接又は間接に、検出可能なシグナルを発生しなければならない。例えば、検出可能な部位は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 又は ^{125}I 等の放射性同位体、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン又はルシフェリン等の蛍光又は化学発光化合物、あるいはアルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ又はセイヨウワサビペルオキシダーゼ等の酵素であってよい。抗体に検出可能な部位を抱合させるためにこの分野で知られた任意の方法が用いられ、それにはHunterら, *Nature* 144:945 (1962); Davidら, *Biochemistry*, 13: 1014 (1974); Painら, *J. Immunol. Meth.*, 40:219 (1981); 及びNygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30:407 (1982)に記載された方法が含まれる。

10

【0125】

また、抗ボールカイン抗体は、組換え細胞培養又は天然供給源からのボールカインのアフィニティー精製にも有用である。この方法においては、ボールカインに対する抗体を、当該分野でよく知られている方法を使用して、セファデックス樹脂や濾紙のような適当な支持体に固定化する。次に、固定化された抗体を精製するボールカインを含む試料と接触させた後、固定化された抗体に結合したボールカイン以外の試料中の物質を実質的に全て除去する適当な溶媒で支持体を洗浄する。最後に、ボールカインを抗体から脱離させる他の適当な溶媒で支持体を洗浄する。

20

以下の実施例は例示するためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

本明細書で引用した全ての特許及び参考文献の全体を、出典明示によりここに取り込む。

30

【実施例】

【0126】

実施例で言及されている全ての市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC受託番号により以下の実施例及び明細書全体を通して特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニアである。

【0127】

実施例1: ヒトボールカインをコードするcDNAクローンの単離

Swiss-Prot公的データベースからの約950の既知の分泌タンパク質からの細胞外ドメイン(ECD)配列(もしあれば、分泌シグナル配列を含む)を、配列データベースの検索に使用した。データベースは、公的データベース(例えば、GenBank)と私的ESTDNAデータベース(LIFESEQTM, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含んでいた。検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST-2(Altschul等, *Methods in Enzymology* 266: 460-480 (1996))を用いて、ECDタンパク質配列と配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70(90の場合もある)又はそれ以上となる比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, WA; <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>)で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。

40

phrapを用いて他のEST配列に対してコンセンサスDNA配列を構築した。そのコンセンサス配列に基づいて、1)PCRにより対象の配列を含むcDNAライブラリを同定す

50

るため、及び2) ボールカインの全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして用いるためにオリゴヌクレオチドを合成した。正方向及び逆方向PCRプライマーは一般的に20から30ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約100-1000bp長のPCR産物を与えるために設計される。プローブ配列は、典型的に40-55bp長である。幾つかの場合には、コンセンサ配列が約1-1.5kbpより大きいときに付加的なオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのDNAを、上掲のAusubel等、Current Protocols in Molecular Biologyにあるように、PCRプライマー対でのPCR増幅によりスクリーニングした。ついで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて対象とする遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

10

【0128】

一对のPCRプライマー(正方向と逆方向)を合成した:

正方向PCRプライマー 5'-CAGCGCCCTCCCCATGTCCCTG-3' (配列番号: 3)

逆方向PCRプライマー 5'-TCCCAACTGGTTTGGAGTTTTCC-3' (配列番号: 4)

また、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを次のヌクレオチド配列を有するコンセンサ配列から構築した:

ハイブリダイゼーションプローブ

5'-CTCCGGTCAGCATGAGGCTCCTGGCGGCCGCTGCTCCTGCTGCTG-3' (配列番号: 5)。

全長クローンソースの幾つかのライブラリをスクリーニングするために、上で特定したPCRプライマー対を用いたPCR増幅によってライブラリのDNAをスクリーニングした。ついでポジティブなライブラリを用いて、プローブオリゴヌクレオチドとPCRプライマーの一方を用いてボールカイン遺伝子をコードするクローンを単離した。

20

cDNAライブラリの構築のためのRNAはヒト胎児腎臓組織から単離した。cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSalIヘミキナーゼアダプターに結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター(pRKB又はpRKD等; pRK5BはSfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である; Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991)参照)に、独特のXhoI及びNotI部位において、所定の方向でクローニングした。

30

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、ボールカインの全長DNA配列(配列番号: 1)及びボールカインの誘導タンパク質配列が得られた。

【0129】

ボールカインの全ヌクレオチド配列は図1(配列番号: 1)に示される。ボールカイン配列は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置167-169に見かけの翻訳開始部位[上掲のKozakら]を持ち、ヌクレオチド位置500-502の終止コドンで終端する。予測されるポリペプチド前駆体は111アミノ酸長である(図2(配列番号: 2))。ボールカインはATCCに寄託した。寄託したクローンが実際の配列を含み、ここに提供される配列は現在の配列決定技術に基づく単なる代表的なものであることが理解される。更に、ここに提供された配列と普遍的な遺伝暗号の知識があれば、任意の与えられたアミノ酸に対応するヌクレオチドを常套的に特定することができ、またその逆もしかりである。

40

完全長ボールカインポリペプチドのアミノ酸配列の分析により、その部分がヒトマクロファージタンパク-2、サイトカイン誘発好中球化学誘引物質2、及び好中球化学走化性因子2-ベータと配列同一性を有していることが示唆され、これはボールカインは新規なケモカインであることが示している。

更に以下において検討するように、cDNAをバキュロウイルスベクター中にサブクローニングし、C末端タグIgG融合タンパク質として昆虫細胞中に発現させた。得られたタンパク質のN末端配列決定により、シグナル配列切断部位が同定され、77アミノ酸の成熟ポリペプチドが得られた。他のヒトCXCKケモカインと31-40%の同一性を示す成

50

熟配列は4のカノニカルなシステイン残基を含むがELRモチーフを欠いている。

【0130】

実施例2：ボールカインコード化DNAのハイブリダイゼーションプローブとしての使用
以下の方法はボールカインをコードしているヌクレオチド配列のハイブリダイゼーション
プローブとしての使用を記載するものである。

全長ボールカインのコード化配列(図1に示す、配列番号：1)を含んでなるDNAを、
ヒト組織cDNAライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリでの相同的DNA(例えば、
ボールカインの天然に生じる変異体をコードしているもの)をスクリーニングするための
プローブとして用いる。

いずれかのライブラリーDNAを含むフィルターのハイブリダイゼーション及び洗浄を以
10 下の高緊縮条件下で実施する。放射標識ボールカイン誘導プローブのフィルターへのハイ
ブリダイゼーションは、50%ホルムアルデヒド、5xSSC、0.1%SDS、0.1
%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、2xデンハード溶液
、及び10%デキストラン硫酸の溶液中で、42°Cにおいて20時間実施される。フィル
ターの洗浄は、0.1xSSC及び0.1%SDSの水溶液中、42°Cで実施される。
ついで、全長天然配列ボールカインをコードするDNAと所望の配列同一性を有するDN
Aは、この分野で知られた標準的な方法を用いて同定できる。

【0131】

実施例3：大腸菌におけるボールカインポリペプチドの発現

この実施例は、大腸菌中における組み換え発現によるボールカインポリペプチドの非グリ
20 コシル化型の調製を例証する。

ボールカインコード化DNA配列(配列番号：1)は選択されたPCRプライマーを利用し
て最初に増幅される。このプライマーは、選択された発現ベクター上の制限酵素部位に対
応する制限酵素部位を含まなければならない。様々な発現ベクターを使用することができ
る。適したベクターの例としては、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性に対する遺伝
子を含むpBR322(大腸菌由来;Bolivarら, Gene, 2:95 (1997)を参照のこと)がある。ベク
ターは制限酵素によって消化され、脱リン酸化される。ついで、PCR増幅配列がベクタ
ーにライゲーションされる。ベクターは好ましくは抗生物質耐性遺伝子、trpプロモータ
ー、ポリhisリーダー(最初の6つのSTIIコドン、ポリhisリーダー、及びエンテロキナー
ゼ切断部位を含む)、ボールカインコード領域、ラムダ転写集結因子及びargU遺伝子をコ
30 ードする配列を含む。

【0132】

ついで、上掲のSambrookらに記載されている方法を用いて選択された大腸菌株を形質転換
するために、このライゲーション混合物を利用した。形質転換体をLBプレート上でのそ
の増殖能力によって同定し、ついで抗生物質耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを
単離し、それを制限酵素分析及びDNA配列決定によって確認することができる。

選択されたクローンを、抗生物質が補填されたLBプロスのような液体培地で一晩かけて
増殖させることができる。この一晩の培養を、引き続きより大きなスケールでの培養を播
種するために使用してもよい。細胞を所望の光学密度になるまで増殖させると、その間に
発現プロモーターが作用し始める。

更に数時間、細胞を培養した後に、遠心分離によって細胞を収集することが可能である。
遠心分離によって得られた細胞ペレットは、当該分野で公知の様々な薬剤を使用して可溶
化でき、ついで、この溶解したボールカインタンパク質を、タンパク質の堅固な結合を可
能にする条件下において金属キレート化カラムを用いて精製すること可能である。

【0133】

実施例4：哺乳動物細胞におけるボールカインポリペプチドの発現

この実施例は、哺乳動物細胞における組換え発現によるグリコシル化した形態のボールカ
インの調製を例証する。

発現ベクターとしてベクターpRK5(1989年3月15日公開のEP307,247参照)を用いる。

場合によっては、ボールカインDNAを選択した制限酵素を持つpRK5に結合させ、
50

上記のSambrook等に記載されたようなライゲーション方法を用いてボールカインDNAを挿入させる。得られたベクターは、pRK5-ボールカインと呼ばれる。

一実施態様では、選択された宿主細胞は293細胞でもよい。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)は、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び/又は抗生物質を添加したDMEMなどの培地中で組織培養プレートにおいて増殖させて集密化した。約10 μ gのpRK5-ボールカインDNAを約1 μ gのVARNA遺伝子コード化DNA[Thimmappayaら, Cell, 31:543 (1982)]と混合し、500 μ lの1mM トリス-HCl、0.1mM EDTA、0.227M CaCl₂に溶解させる。この混合物に、500 μ lの50mM HEPES(pH 7.35)、280mM NaCl、1.5mM NaPO₄を一滴ずつ添加し、25で10分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、293細胞に加えて37で約4時間定着させる。培地を吸引し、2mlのPBS中20%グリセロールを30秒間添加した。293細胞は、ついで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートする。

10

20

30

40

50

【0134】

形質移入の約24時間後、培地を除去し、培地(単独)又は200 μ Ci/ml³⁵S-システイン及び200 μ Ci/ml³⁵S-メチオニンを含む培地で置換した。12時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、16%SDSゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、ボールカインポリペプチドの存在を現す選択された時間にわたってフィルムにさらした。形質転換した細胞を含む培地に、更なるインキュベーションを施し(無血清培地で)、培地を選択されたバイオアッセイで試験する。

これに代わる方法では、ボールカインは、Sompayracら, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて293細胞に一過的に導入される。293細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで増殖させ、700 μ gのpRK5-ボールカインDNAを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄した。DNA-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートした。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培地で洗浄し、組織培地、5 μ g/mlウシインシュリン及び0.1 μ g/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約4日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いで発現されたボールカインを含む試料を濃縮し、透析及び/又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製した。

【0135】

他の実施態様では、ボールカインをCHO細胞で発現させることができる。pRK5-ボールカインは、CaPO₄又はDEAE-デキストランなどの公知の試薬を用いてCHO細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地(単独)又は³⁵S-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。ボールカインポリペプチドの存在を同定した後、培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約6日間インキュベートし、次いで条件培地を収集する。次いで、発現されたボールカインを含む培地を濃縮して、任意の選択した方法によって精製することができる。

また、エピトプタグボールカインは、宿主CHO細胞において発現させてもよい。ボールカインはpRK5ベクターからサブクロニングしてもよい。サブクロン挿入物は、PCRを施してパキウウイルス発現ベクター中のポリ-hisタグ等の選択されたエピトプタグを持つ枠に融合できる。ポリ-hisタグボールカイン挿入物は、次いで、安定なクロンの選択のためのDHFR等の選択マーカを含むSV40誘導ベクターにサブクロニングできる。最後に、CHO細胞をSV40誘導ベクターで(上記のように)形質移入した。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-hisタグボールカインを含む培地は、次いで濃縮し、Ni²⁺-キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。

【0136】

実施例 5 : 酵母菌でのボールカインポリペプチドの発現

以下の方法は、酵母菌中でのボールカインの組換え発現を記載する。最初に、ADH2/GAPDH プロモーターからのボールカインの細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。ボールカインをコードするDNA及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してボールカインの細胞内発現を指示する。分泌のために、ボールカインをコードするDNAを選択したプラスミドに、ADH2/GAPDHプロモーターをコードするDNA、天然ボールカインシグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌因子又はインペルターゼ分泌シグナル/リーダー配列、及び(必要ならば)ボールカインの発現のためのリンカー配列とともにクローニングすることができる。酵母菌株AB110酵母菌株は、ついで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、10%トリクロロ酢酸での沈降及びSDS-PAGEによる分離で分析し、次いでクーマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。

10

続いて組換えボールカインは、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。ボールカインを含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。

【0137】

実施例 6 : ボールカインポリペプチドに結合する抗体の調製

この実施例は、ボールカインに特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

20

モノクローナル抗体の生産のための技術は、当該分野で知られており、例えば上記のGodingに記載されている。用いることができる免疫原は、精製ボールカイン、ボールカインを含む融合タンパク質、細胞表面に組換えボールカインを発現する細胞を含む。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなくすることができる。

Balb/c等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に1-100マイクログラムで注入したボールカイン免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をMPL-TDMアジュバント(Ribi Immunochemical Research, ハミルトン, モンタナ)に乳化し、動物の後フットパッドに注入してもよい。免疫化したマウスは、ついで10から12日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗ボールカイン抗体の検出のためのエライザアッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

30

【0138】

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「陽性」の動物に、ボールカイン静脈内注射の最後の注入をすることができる。3から4日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出した。次いで脾臓細胞を(35%ポリエチレングリコールを用いて)、ATCCから番号CRL1597で入手可能なP3X63AgU.1等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、ついで、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン)培地を含む96ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

40

ハイブリドーマ細胞は、ボールカインに対する反応性についてのエライザでスクリーニングされる。ボールカインに対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「陽性(ポジティブ)」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

陽性ハイブリドーマ細胞を同系のBalb/cマウスに腹腔内注入し、抗ボールカインモノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで増殖させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインA又はプロテインGへの親和性に基づくアフィニティクロマトグラフィーを用いることもできる。

50

【0139】

実施例7：バキュロウイルス感染昆虫細胞でのボールカインポリペプチドの発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中におけるボールカインポリペプチドの組換え発現を記載する。

一般に、ボールカインをコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させる。このようなエピトープタグは、ポリ-hisタグ及び免疫グロブリンタグ (IgGのFc領域など) を含む。pVL1393 (Novagen) などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単には、ボールカインコード化DNA又はボールカインコード化DNAの所望部分 (例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列) が、5'及び3'領域に相補的なプライマーでのPCRにより増幅される。5'プライマーは、隣接する (選択された) 制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、ついで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

10

ついで断片をその各部位を介してpb.PH.IgG中にサブクローニングした。pb.PH.IgGプラスミドはpVL1393プラスミド (Pharmingen) の誘導體であり、クローニング部位の下流にヒトIgG遺伝子のFc領域をコードしている。

一般に組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold (商品名) ウイルスDNA (Pharmingen) を、Spodoptera frugiperda (「Sf9」) 細胞 (ATCC CRL 1711) 中にリポフェクチン (GIBCO-BRLから市販) を用いて同時形質移入することにより作成される。28で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilleyら, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施した。

20

【0140】

この場合、pb.PH.SST DNA.IgGプラスミドを、10%仔ウシ血清 (FBS) (Hyclone) を補填したHinkのTNM-FH培地 (JRH Biosciences) 中で成長させた 10^5 のSf9細胞中にリポフェクチン (Gibco BRL) を使用してBaculoGoldバキュロウイルスDNA (Pharmingen) と共に同時形質移入した。細胞を28で5日間インキュベートした。上清を集めた後、10の近似感染効率 (MOI) で10% FBSを補填したHinkのTNM-FH培地中でSf9細胞を感染させることによって第一回ウイルス増幅に使用した。細胞を28で3日間インキュベートした。上清を集め、組換えボールカイン-IgGの発現を、30 μ Lのプロテイン-AセファロースCL-4Bビーズ (Pharmacia) へ1mLの上清をバッチ結合させた後、クーマシーブルー染色によって既知の濃度のタンパク質標準マーカと比較する続くSDS-PAGEによって決定した。

30

最初のウイルス増幅上清を用いて、0.1の近似MOIでESF-921培地 (Expression Systems LLC) 中で成長させたSf9細胞の500mLの攪拌培養物を感染させた。細胞を28で3日間インキュベートした。上清を集めて濾過した。バッチ結合とSDS-PAGE分析を繰り返して攪拌培養物中の発現を確認した。続いて500mLの上清を精製にまわした。

【0141】

一般に、発現されたポリ-hisタグボールカインポリペプチドは、次に、例えばNi²⁺-キレートアフィニティークロマトグラフィーにより次のようにして精製される。抽出物は、Rupertら, Nature, 362:175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染した組換えSf9細胞から調製される。簡便には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー (25mLのHepes、pH7.9; 12.5mMのMgCl₂; 0.1mMのEDTA; 10%グリセロール; 0.1%のNP-40; 0.1MのKCl) 中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理する。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を充填バッファー (50mMのリン酸塩、300mM NaCl、10%のグリセロール、pH7.8) で50倍希釈し、0.45ミクロンのフィルターで濾過する。Ni²⁺-NTAアガロースカラム (Qiagenから市販) を5mLの総容積で調製し、25mLの水で洗浄し、25mL

40

50

の充填バッファーで平衡化させる。濾過した細胞抽出物は、毎分0.5 mLでカラムに充填される。カラムを、分画回収が始まる点であるA₂₈₀のベースラインまで充填バッファーで洗浄する。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー(50 mMのリン酸塩; 300 mMのNaCl、10%のグリセロール、pH 6.0)で洗浄した。A₂₈₀のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で0から500 mMのイミダゾール勾配で展開した。1 mLの分画を回収し、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ(Qiagen)に結合したNi²⁺-NTAでのウェスタンブロットにより分析する。溶離したHis₁₀-タグボールカインポリペプチドを含む画分をプールして充填バッファーで透析する。

あるいは、IgGタグ(又はFcタグ)ボールカインポリペプチドの精製は、例えば、プロテインA又はプロテインGカラムクロマトグラフィーを含む既知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。 10

【0142】

この場合、形質移入したSf9細胞からの馴化培地(500 mL、上記を参照)を遠心分離で集めて細胞を除去し、0.22ミクロンフィルターで濾過した。ボールカインタンパク質のイムノアドヘシン(Fc含有)構築物を馴化培地から精製した。その馴化培地を、20 mMのリン酸Na、pH 6.8バッファーで平衡にした5 mLのプロテインAカラム(Pharmacia)にポンプで供給した。充填後、100 mMのクエン酸、pH 3.5と共に溶離前の平衡バッファーでカラムを十分に洗浄した。溶離したタンパク質を、275 µLの1 Mトリス、pH 9バッファーを含むチューブ中に1 mLの画分を収集することによって即座に中和させた。つづいて高度に精製したタンパク質を、25 mLのG25 Superfine(Pharmacia)カラムと共に10 mMのHepes、0.14 MのNaCl及び4%のマニトール、pH 6.8を含む貯蔵バッファー中で脱塩し、-80℃で貯蔵した。タンパク質の均質性をSDSポリアクリルアミドゲル及びエドマン分解法によるN末端アミノ酸シーケンシングによって評価した。 20

ボールカインによってコードされた精製タンパク質をトリス-HClゲルで分離し、PVDFメンブレンにエレクトロブロッティングした。対象のバンドを切り取った後、タンパク質産物を確認するためにエドマン分解法にかけた。

【0143】

実施例8:ノーザンブロット分析 30

ヒト組織におけるボールカインmRNAの発現をノーザンブロット分析によって検査した。一般に、ヒトRNAブロットを、全長ボールカインcDNAに基づいて³²P標識DNAプローブにハイブリダイズさせた; プローブはボールカインcDNA挿入断片を消化し精製することにより産生した。ヒト胎児RNAブロットMTN(クローンテック)及び成人RNAブロットMTN-II(クローンテック)をDNAプローブと共にインキュベートした。ブロットはハイブリダイゼーションバッファー(5X SSPE; 2X デンハード溶液; 100 mg/mLの変性剪断サケ精子DNA; 50%のホルムアミド; 2%のSDS)中でプローブと共に42℃で60時間インキュベートした。ブロットを2X SSC; 0.05%のSDS中、室温で1時間、数回洗浄し、ついで0.1X SSC; 0.1%のSDS中、50℃で30分間洗浄した。ブロットを終夜露出した後、リン光体イメージャー分析(Fuji)により現像した。 40

この場合、様々な組織由来のヒトポリ(A)+RNAを含むノーザンブロット(2 µL/レーン)をクローンテックから購入した。ボールカインの全コード化領域を含む469 bpの断片を、それぞれ正方向及び逆方向の次の二つのプライマー:

正方向プライマー: 5'AGCGCACGGCCACAGACAG3'(配列番号: 6)

及び

逆方向プライマー: 5'GACCCTGCGCTTCTCGTTCCA3'(配列番号: 7)

を用いてPCRにより増幅させた。

ボールカイン特異的[³²P]dCTP標識cDNAプローブを、この469 bpの断片のランダムプライミング(High Prime, Boehringer Mannheim)によって合成し、導入され 50

なかったヌクレオチドを除去した (NucTrap Probe Purification Column, Stratagene) 。メンブレンを過去に記載されているようにして (McMaster, M.T.ら, J.Immunol. 154(8):3778, 1995) ノーザンブロットハイブリダイゼーションによって分析した。

図3に示されるように、ボールカインmRNA転写物が検出された。2kbの転写物が様々な組織中に低いレベルで検出された。脾臓、リンパ節、大腸において中程度の発現で、腎臓と小腸で最も高いレベルの発現であった。肺及び刺激されていない末梢血白血球 (PBL) では発現が検出することができない。

【0144】

実施例9：発現パターンを示すインサイツハイブリダイゼーション

ホルマリン固定、パラフィン包埋した正常な及び病気のヒト胎児及び成体組織を切片化し、脱パラフィンし、プロテイナーゼK (20mg/ml) で37℃にて15分間脱タンパクし、さらに、記載されているようにして (Lu L.H.及びGillett NA(Cell Vision 1: 169-176, 1994)、インサイツハイブリダイゼーションのために加工した。[³³P]UTP標識アンチセンスリボプローブを463bpのPCR産物 (ノーザン分析に対して記載したプライマー配列) から生成した。スライドをコダックNTB2核トラックエマルジョンに浸漬し4週間露出させた。

検査した胎児組織は次のものを含む：胎盤、臍帯、肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、肺、心臓、大血管、食道、胃、小腸、脾臓、胸腺、膵臓、脳、眼、脊髄、体壁、骨盤及び下肢。検査した成体組織は、肝臓、腎臓、副腎、心筋、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺、皮膚、大脳皮質 (rm)、海馬 (rm)、眼、胃、胃癌、大腸、大腸癌、甲状腺 (チンパンジー)、副甲状腺 (チンパンジー)、卵巣 (チンパンジー) 及び軟骨肉腫を含む。アセトアミノフェンは肝臓障害及び肝硬変を誘発した。

【0145】

結果は、暗視野 (右の枠) と明視野のH&E染色組織 (左の枠) の双方を含む顕微鏡写真である図4A-4Eに示される。強いシグナルが様々なヒト組織で見られた。図4Aは基底層の上皮細胞中に特異的な強い発現を示した正常な皮膚を示す；表皮の最も深く最も多い層は、皮膚中のかぶさる上皮細胞の全てに対する前駆体である基底膜に沿う細胞の単細胞厚層である。下側の層 (有棘層、顆粒層等々) の上皮細胞中には発現はなかった。発現は表皮の直ぐ下にある結合組織である真皮中でまた明らかであった。図4Bは胎児の腎臓を示している。胎児の腎臓では、発現は発育中の細管において特異的であり、発現は細管上皮に見られた。図4C及び図4Dはそれぞれ胎児腸及び成体腸である。正常な成人のヒト大腸及び胎児腸の切片について発現を評価した。両方の腸試料には、絨毛の固有層内に多巣的パターンでの中程度から強い特異的発現があった。図4Eは発現について評価した大脳切片である。大脳切片では、浅皮質ニューロンのサブセット中に強い特異的な発現があった；そのパターンは明確であり、皮質中に存在する特異的ニューロン集団であることが示唆される。

【0146】

実施例10：混合リンパ球反応 (MLR) アッセイ (24番) における刺激活性

この実施例は、本発明の所定のペプチドが、Tリンパ球の増殖の刺激剤として活性であることを示す。リンパ球の増殖を刺激する化合物は、免疫応答の増強が有益な場合に治療的に有用である。治療剤は、ボールカインのアンタゴニストの形をとり得、例えば、ポリペプチドに対するマウス-ヒトキメラ、ヒト化又はヒト抗体であり、Tリンパ球の増殖を阻害することが期待される。

このアッセイの基本的プロトコールは、Current Protocols in Immunology, unit3.12; J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober編, 国立衛生研究所, John Wiley & Sons, Incに記載されている。

さらに具体的には、このアッセイの一変形例では、末梢血単核細胞 (PBMC) を個々の哺乳類、例えばヒトのボランティアからロイコフェレーシスにより単離する (一人のドナーにはスティミュレーターPBMCを供給し、他のドナーにはレスポンドーPBMCを供給する)。所望される場合、単離後に、細胞を仔ウシ血清及びDMSO中で凍結する。凍結

10

20

30

40

50

細胞をアッセイ用培地(37、5%CO₂)で一晩解凍し、ついで洗浄し、3×10⁶細胞/mlのアッセイ用培地(RPMI; 10%仔ウシ血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1%グルタミン、1%HEPES、1%非必須アミノ酸、1%ピルビン酸塩)に再懸濁する。スティミュレーターPBMCは、細胞に照射する(約300ラド)ことによって調製される。このアッセイは100:1の1%又は0.1%に希釈された被験試料、50:1の照射を受けたスティミュレーター細胞、及び50:1のレスポンドーPBMC細胞の混合物を三組ウェルに蒔くことによって調製される。100マイクロリットルの細胞培養培地又は100マイクロリットルのCD4-IgGをコントロールとして使用する。ついで、ウェルを37、5%CO₂で4日間インキュベートする。5日目に、各ウェルヘトリチウム化チミジン(1.0mCi/ウェル; Amersham)を適用する。6時間後に細胞を3回洗浄し、ついで標識の取込を評価する。

10

【0147】

このアッセイの他の変形例では、PBMCをBalb/cマウス及びC57B6マウスの脾臓から単離する。細胞を、アッセイ用培地(RPMI; 10%仔ウシ血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1%グルタミン、1%HEPES、1%非必須アミノ酸、1%ピルバート)において、新たに収集した脾臓から取り出して細かく切断し、PBMCを、リンパライトM(Lympholyte M)(Organon Teknika)上にこれらの細胞をオーバーレイし、2000rpmで20分間遠心分離し、回収し、アッセイ用培地で単核細胞層を洗浄し、アッセイ用培地で1×10⁷細胞/mlになるように細胞を再懸濁させることによって単離する。ついで、このアッセイは上述のように行われる。本発明の化合物に対するこのアッセイの結果は以下の表7に示される。コントロールに対する増加はポジティブであると考えられ、180%以上又は180%と同等の増加が好ましい。しかしながら、コントロールより大きい全ての値は、試験タンパク質に対して刺激効果を示す。

20

【表7】

表7

PRO	PRO濃度	コントロールに対する増加パーセント
ボールカイン	12.40 nM	112.0
ボールカイン	124.00 nM	192.7

30

【0148】

実施例11:皮膚血管透過性アッセイ(64番)

このアッセイは、ボールカインが免疫系を刺激し、動物の注射部位に単核球、好酸球及びPMN浸潤を誘導することにより炎症を誘発し得ることを示す。この皮膚血管透過性アッセイは以下のように行われる。350g又はそれ以上の無毛モルモットにケタミン(70-80mg/kg)と5mg/kgのキシラジンを筋肉内投与(IM)して麻酔をかける。精製したボールカインポリペプチド又は馴化培地被験試料を、注射部位当たり100mLで試験動物の背に皮内注射する。動物当たりおよそ10-30、好ましくは16-24の注射部位を有することが可能である。ついで1mLのエバンスブルー染料(1%の緩衝化された生理的食塩水)を心臓内注射する。そして、注射部位の斑点を注射後1時間、6時間及び24時間の時点で測定する(mm直径)。動物は、注射から適当な時間経過後に犠牲にした。各々の皮膚注射部位を切り取ってパラホルムアルデヒドに固定する。そして、その皮膚を、組織病理学的評価のために調製する。各々の部位は、皮膚への炎症性細胞湿潤について評価される。可視可能な炎症細胞炎症を持つ部位は、陽性と記録される。炎症細胞は、好中球、好酸球、単核球又はリンパ球である可能性がある。少なくとも、注射部位の最小血管周囲湿潤物は陽性と記録され、注射部位の湿潤物でないものは陰性と記録される。このアッセイにおいてボールカインは陽性であった。

40

【0149】

50

実施例 12 : E S 細胞のニューロン分化 (1 3 7 番)

E S 細胞を 2 日間 E S + L I F 培地 [分化を停止させるため] 中、 2 4 ウェルプレートにてクローン密度で成長させ、小コロニーを形成させる。ついで培地を様々な量のボールカインタンパク質を含む L I F、 K S R 培地に変え、 E S クローンを培養物中で 7 日間、成長させ分化させる。 7 日目に細胞を固定しニューロンマーカー M A P 2 に対する抗体を用いる免疫細胞化学検査のために加工する。ニューロンの分化の程度は蛍光顕微鏡を使用して評価する。

E S 培地 - 高グルコース D M E M - 1 0 % 仔ウシ血清 - S C 培地補填 - プラス L I F - K S R 培地 - G M E M - 1 0 % K S R [ノックアウト血清置換サプリメント] - グルタミン - P e n / S t r e p - 非必須アミノ酸 - 及び 2 - M E 。固定 - 4 % パラホルムアルデヒド - 3 % 正常ヤギ血清を伴う P B S T [0 . 1 % トリトン] 中で 1 : 1 0 0 0 で希釈された M A P 2 抗体 [Pharmingen] 。

10

結果はニューロンを含む E S コロニーの % と個々のコロニー内のニューロンの % として計算する。

ニューロンコロニーとバックグラウンドより 1 0 x の細胞カウントのウェルを、陽性で、ニューロン分化に影響を及ぼすタンパク質を含むと考える。 1 2 4 . 0 0 n M の最終濃度のボールカインはニューロン分化が陽性であるとの試験結果となった。

【 0 1 5 0 】

実施例 13 : 特異的抗体を用いたボールカインポリペプチドの精製

天然又は組換えボールカインポリペプチドは、タンパク質精製の分野の種々の標準的な方法によって精製できる。例えば、プロボールカインポリペプチド、成熟ボールカインポリペプチド、又はプレボールカインポリペプチドは、対象とするボールカインポリペプチドに特異的な抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一般に、免疫親和性カラムは抗ボールカインポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合させて構築される。

20

ポリクロール免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムでの沈殿又は固定化プロテイン A (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.) での精製のいずれかにより免疫血清から調製される。同様に、モノクロール抗体は、硫酸アンモニウム沈殿又は固定化プロテイン A でのクロマトグラフィーによりマウス腹水液から調製される。部分的に精製された免疫グロブリンは、 C n B r 活性化 SEPHAROSETM (Pharmacia LKB Biotechnology) 等のクロマトグラフィー樹脂に共有結合される。抗体が樹脂に結合され、樹脂がブロックされ、誘導体樹脂は製造者の指示に従って洗浄される。

30

【 0 1 5 1 】

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態のボールカインポリペプチドを含む細胞からの画分を調製することによるボールカインポリペプチドの精製において利用される。この調製物は、界面活性剤の添加又はこの分野で公知の方法により分画遠心法を介して得られる全細胞又は細胞成分画分の可溶化により得られる。あるいは、シグナル配列を含む可溶性ボールカインポリペプチドは、細胞が増殖される培地中に有用な量で分泌されうる。

可溶性ボールカインポリペプチド含有調製物は、免疫親和性カラムを通され、カラムはボールカインポリペプチドの好ましい吸着を可能ならしめる条件下 (例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー) で洗浄される。ついで、カラムは、抗体 / ボールカインポリペプチド結合を分解する条件下 (例えば、約 2 - 3 といった低 p H、又は高濃度の尿素又はチオシアン酸イオン等のカオトロップ) で溶離され、ボールカインポリペプチドが回収される。

40

【 0 1 5 2 】

実施例 14 : 薬物スクリーニング

本発明は、種々の薬物スクリーニング技術の任意のものにおいてボールカインポリペプチド又はその結合断片を使用することによる化合物のスクリーニングに対して特に有用である。そのような試験に用いられるボールカインポリペプチド又は断片は、溶液中に遊離した状態でも、固体支持体に固定されても、細胞表面に担持されていても、あるいは細胞内

50

に位置していてもよい。薬剤スクリーニングの一つの方法では、ボールカインポリペプチド又は断片を発現する組換え核酸で安定に形質移入される真核生物又は原核生物宿主細胞を利用する。薬剤は、そのような形質移入細胞に対して、競合的結合アッセイによってスクリーニングされる。生存可能又は固定化形態のいずれかによって、このような細胞は標準的な結合アッセイで使用できる。例えば、ボールカインポリペプチド又は断片と試験される試薬の間での複合体の形成を測定してよい。あるいは、試験する試薬によって生ずるボールカインポリペプチドとその標的細胞又は標的レセプターとの間の複合体形成における減少を試験することもできる。

従って、本発明は、ボールカインポリペプチド関連疾患又は障害に影響を与えうる薬剤又は任意の他の試薬のスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、当該分野で良く知られている手法により、その試薬をボールカインポリペプチド又は断片に接触させ、(i) 試薬とボールカインポリペプチド又は断片との間の複合体の存在について、又は(ii) ボールカインポリペプチド又は断片と細胞との間の複合体の存在について検定することを含む。これらの競合結合アッセイでは、ボールカインポリペプチド又は断片が典型的には標識される。適切なインキュベーションの後、遊離のボールカインポリペプチド又は断片を結合形態のものから分離し、遊離又は未複合の標識の量が、特定の試薬がボールカインポリペプチドに結合する又はボールカインポリペプチド/細胞複合体を阻害する能力の尺度となる。

【0153】

薬剤スクリーニングのための他の技術は、ポリペプチドに対して適当な結合親和性を持つ化合物についてのハイスループットスクリーニングを提供し、1984年9月13日に公開されたW084/03564に詳細に記載されている。簡単に述べれば、多数の異なる小型ペプチド試験化合物が、プラスチックピン等の固体支持体又は幾つかの他の表面上で合成される。ボールカインポリペプチドに適用すると、ペプチド試験化合物はボールカインポリペプチドと反応して洗浄される。結合したボールカインポリペプチドはこの分野で良く知られた方法により検出される。精製したボールカインポリペプチドは、上記の薬剤スクリーニング技術に使用するためにプレート上に直接被覆することもできる。さらに、非中和抗体は、ペプチドを捕捉し、それを固体支持体上に固定化するのに使用できる。

また、本発明は、ボールカインポリペプチドに結合可能な中和抗体がボールカインポリペプチド又はその断片について試験化合物と特異的に競合する競合薬剤スクリーニングアッセイの使用も考慮する。このようにして、抗体は、ボールカインポリペプチドで、一又は複数の抗原決定基を持つ任意のペプチドの存在を検出するのに使用できる。

【0154】

実施例15：合理的薬物設計

合理的薬物設計の目的は、対象とする生物学的活性ポリペプチド(すなわち、ボールカインポリペプチド)又はそれらが相互作用する小分子、例えばアゴニスト、アンタゴニスト、又はインヒビターの構造的類似物を製造することである。これらの例の任意のものが、ボールカインポリペプチドのより活性で安定な形態又はインビボでボールカインポリペプチドに機能を促進又は阻害する薬物の創り出すのに使用できる(参考、Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991))。

一つのアプローチ法では、ボールカインポリペプチド、又はボールカインポリペプチド-インヒビター複合体の三次元構造が、x-線結晶学により、コンピュータモデル化により、最も典型的には2つの方法の組み合わせにより決定される。分子の構造を解明し活性部位を決定するためには、ボールカインポリペプチドの形状及び電荷の両方が確認されなければならない。数は少ないが、ボールカインポリペプチドの構造に関する有用な情報が相同タンパク質の構造に基づいたモデル化によって得られることもある。両方の場合において、関連する構造情報は、類似ボールカインポリペプチド様分子の設計又は効果的なインヒビターの同定に使用される。合理的な薬剤設計の有用な例は、Braxton及びWells, Biochemistry, 31: 7796-7801 (1992)に示されているような向上した活性又は安定性を持つ分子、又はAthaudaら, J. Biochem., 113: 742-746 (1993)に示されているような天然ペプチ

10

20

30

40

50

ドのインヒビター、アゴニスト、又はアンタゴニストとして作用する分子を含みうる。

【0155】

また、上記のような機能アッセイによって選択された標的特異的な抗体を単離しその結晶構造を解明することもできる。この方法は、原理的には、それに続く薬剤設計が基礎をおくことのできるファーマコア(pharmacore)を生成する。機能的な薬理学的に活性な抗体に対する抗-イデオタイプ抗体(抗-ids)を生成することにより、タンパク質結晶学をバイパスすることができる。鏡像の鏡像として、抗-idsの結合部位は最初のレセプターの類似物であると予測できる。抗-idは、ついで、化学的又は生物学的に製造したペプチドのバンクからペプチドを同定及び単離するのに使用できる。単離されたペプチドは、ファーマコアとして機能するであろう。

10

本発明によって、X線結晶学などの分析実験を実施するために十分な量のボールカインポリペプチドが入手可能である。さらに、ここに提供したボールカインポリペプチドアミノ酸配列の知識は、X線結晶学に代わる又はそれに加わるコンピュータモデル化技術で用いられるガイダンスを提供する。

【0156】

材料の寄託

次の材料をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, 10801 ユニバーシティ・ブルバード、マナッサス、バージニア20110-2209米国(ATCC)へ寄託した：

【表8】

20

材料	ATCC 寄託番号	寄託日
DNA39523-1192(ボールカイン)	209424	1997年10月31日

【0157】

これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存培養物が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、何れが最初に来ようとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号8860G638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

30

本出願の譲受人は、寄託した材料の培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死滅もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと速やかに取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの材料の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に変形することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

40

【図面の簡単な説明】

【0158】

【図1】天然配列ボールカインcDNAのヌクレオチド配列(配列番号：1)を示し、こ

50

ここで配列番号：1はここにおいてボールカインと命名したクローンである。

【図2】図1に示された配列番号：1のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：2）を示す。

【図3】ボールカインをコードする核酸を分析するノーザンプロットの結果を示す。

【図4A】ボールカインをコードする核酸について実施したインサイトハイブリダイゼーションの結果を示す顕微鏡写真である。胎児の皮膚を示し、右の枠は暗視野顕微鏡検査で、インサイトを示し、左の枠は通常の明視野顕微鏡検査である。

【図4B】ボールカインをコードする核酸について実施したインサイトハイブリダイゼーションの結果を示す顕微鏡写真である。胎児の腎臓を示し、右の枠は暗視野顕微鏡検査で、インサイトを示し、左の枠は通常の明視野顕微鏡検査である。

【図4C】ボールカインをコードする核酸について実施したインサイトハイブリダイゼーションの結果を示す顕微鏡写真である。胎児の腸を示し、右の枠は暗視野顕微鏡検査で、インサイトを示し、左の枠は通常の明視野顕微鏡検査である。

【図4D】ボールカインをコードする核酸について実施したインサイトハイブリダイゼーションの結果を示す顕微鏡写真である。成人の腸を示し、右の枠は暗視野顕微鏡検査で、インサイトを示し、左の枠は通常の明視野顕微鏡検査である。

【図4E】ボールカインをコードする核酸について実施したインサイトハイブリダイゼーションの結果を示す顕微鏡写真である。大脳を示し、右の枠は暗視野顕微鏡検査で、インサイトを示し、左の枠は通常の明視野顕微鏡検査である。

10

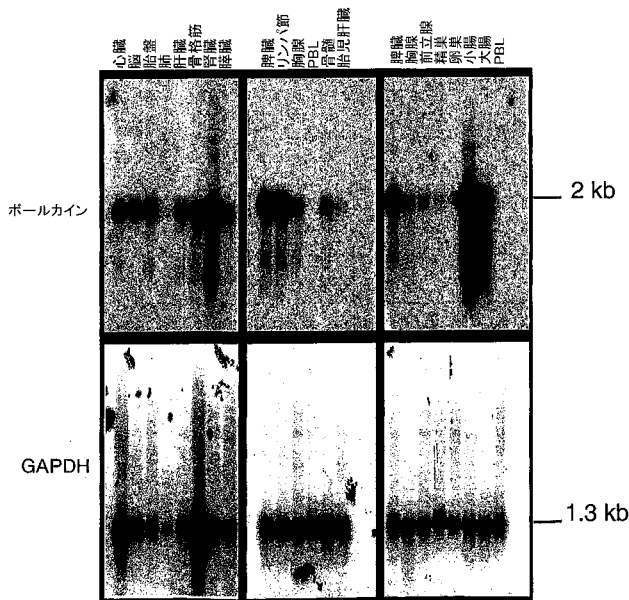
【図1】

```

GCGGAGACAGGCGCAGAGCGCAGCGCCAGCCAGACAGCCCTGGGCATCCACCGAGG
CGCAGCCCGAGGCCAGCAGAGCGGAGGCGGCGCCCGGGCAGAGAAAGCCGAGCAGAGCT
GGGTGGGCTCTCGGGCCGCGCTCCGACGGGCGCAGCGCCCTCCCGAAGCTCCCTGCTCCC
ACGCGCGGCGCCCTCCGCTCAGCATGAGGCTCTGCGGCGCGCTGCTCTCTCTGCTGCT
GGCGCTGTACACCGCGCTGGAGCGGTCCAAATGCAAGTCTCCCGGAAAGGACCCAA
GATCCGCTACAGCGACGTGAAGAAGCTGAAATGAAGCCAAAGTACCCGCACTGCGAGGA
GAAGATGGTTATCATCACCAACCAAGAGCGTGTCCAGGTACCGAGGTCAAGAGCACTGCT
GCACCCCAAGCTGCAGAGCACCAAGCGCTTCATCAAGTGGTACAAAGCTGGAACGAGAA
GCGCAGGCTCTCGAAGAATAAGGTGAAAAACCTCAGAAGGGAAAACTCCAAACAGTTG
GGAGACTTGTCAAAGGACTTTGCAGATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAGCTTTCCTTCTCACAGGCATAAGACAAATTAATATTTATGA
AGCACTTTTACCAACCGCTCAGTTTTCATTTTATAGCTGCGTGGGAAAGGCTTCCAGA
TGGGAGACCCATCTCTTGTGCTCCAGACTCATCACAGGCTGCTTTTATCAAAGG
GGAAAACTCATGCTTTCCTTTTAAAAAATGCTTTTTTTTATTTGTCCTACTACTA
TACATCTGAGCTTTATAAGCGCCCGGAGAACAAATGAGCTTGGTGGACATTTTCAITG
CAGTGTTCCTCCATCTAGCTTGGGAGCTTCCGCTTAGAGGCTGCGGCTCAGGAC
AGCTGCCACGGGCTCTCTGGGCTTAAGCGGCTCACAGCCTCAGTGTGACTCCACAGTG
GCCCTGTAGCCGGCAAGCAGGAGCAGGCTCTCTGCATCTGTTCTCTGAGGAACCAA
GTTTGGTGGCAGAAAAATGTGCTTCAATCCCGCTGTTAAATTTTACACACCTTAGGA
AACATTTCCAGATCCTGTGATGGCGAGACAAATGATCCTTAAGAGAGGTGTGGGCTCT
TCCCAACCTGAGGATTTCTGAAAAGTTTACAGGTTCAATATTTAATGCTTCAGAAGCATG
TGAGGTTCCCAACACTGTGAGCAAAAACCTTAGSAGAAAACTTAAAAATATATGATAACA
TGGCAATACACAGCTACAGACACACACTTCTGTGACAAAGGAAAACTTCAAGCATGT
TTCTTTCCCTCACCCACAAGAACATGCACTACTAAGCAATATATTTGTGATTCGCCAT
GTAATTTCTCAATGTAAACAGTGCAGTCTCTTTTGAAGCTAAGATGACCATGCGGCC
TTCCCTGTAACATATACCTTAGAAGCGCCCTCCACACACTGCCCCCAGTATATGC
CGCATTGTACTGCTGTATATGATGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
GGTTTCAATTTCTTCTAAGATGGAAGTAATAAATAATATTTGAAATGTAATAAAAAA
AAAAA

```

【図3】



【図2】

```

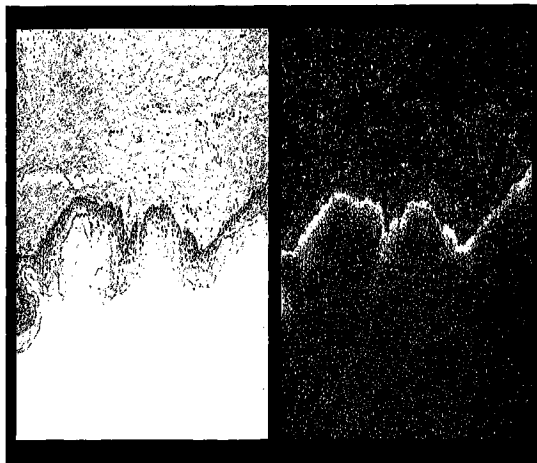
MSLLPRRAPPVSMRLAAALLLLLYTARVDGSKCKSRKPKIRYSDVKLEMKPKYPHCEE
KMVIIITKSVRYRGQEHCLHPLKQSTKRPIKWNNAWNEKRRVYVE

```

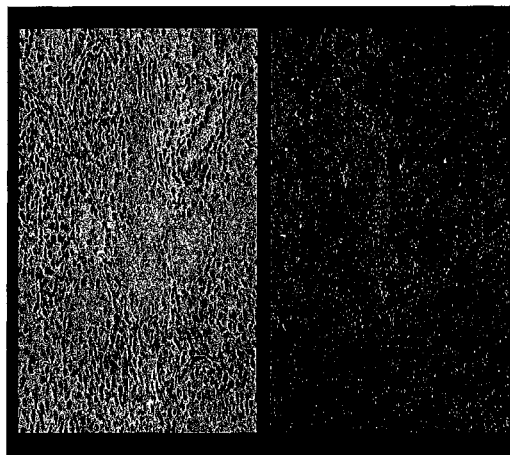
シグナル配列
1-34

N-ミリスチル化部位
80-85

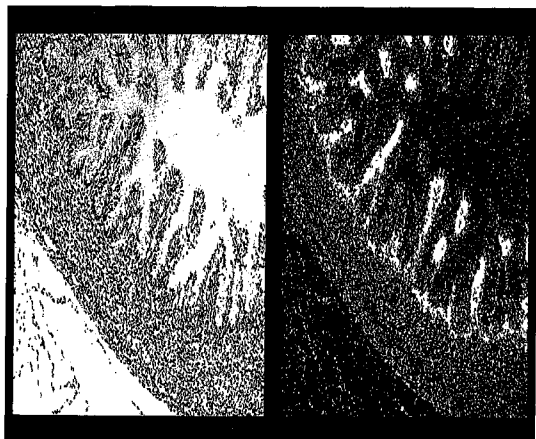
【 図 4 A 】



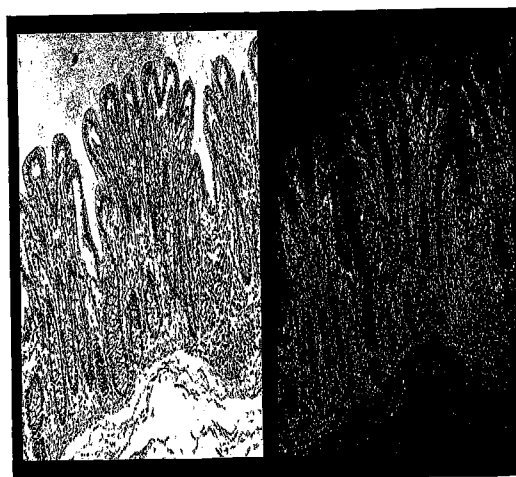
【 図 4 B 】



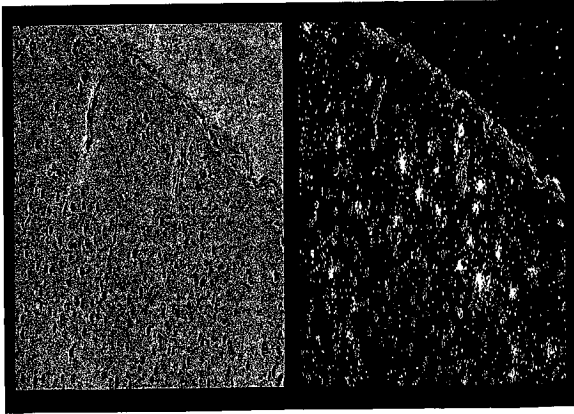
【 図 4 C 】



【 図 4 D 】



【 図 4 E 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/077028 A1

- (51) International Patent Classification: C07K 14/52, C12N 15/00
- (21) International Application Number: PCT/US01/09552
- (22) International Filing Date: 22 March 2001 (22.03.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (71) Applicant: GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).
- (72) Inventors: FONG, Sherman, 19 Basinside Way, Alameda, CA 94502 (US); GODDARD, Audrey, 110 Congo Street, San Francisco, CA 94131 (US); HILLMAN, Kenneth, Jr., 64 Seward Street, San Francisco, CA 94114 (US); ROTH, Iric, 251 Parnassus Avenue #1, San Francisco, CA 94117 (US); WOOD, William, I., 35 Southdown Court, Hillsborough, CA 94010 (US).
- (74) Agents: CARPENTER, David, A. et al., Genentech, Inc., MS49, 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AI, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, FE, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NI, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/077028 A1

(54) Title: POLYPEPTIDES AND NUCLEIC ACIDS FOR BOLEKINE

(57) Abstract: The present invention is directed to Bolekine polypeptides and to nucleic acid molecules encoding those polypeptides. Also provided herein are vectors and host cells comprising those nucleic acid sequences, chimeric polypeptide molecules comprising the polypeptides of the present invention fused to heterologous polypeptide sequences, antibodies which bind to the polypeptides of the present invention and to methods for producing the polypeptides of the present invention.

WO 02/077028

PCT/US01/09552

POLYPEPTIDES AND NUCLEIC ACIDS FOR BOLEKINE

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates generally to the identification and isolation of novel DNA and to the recombinant production of novel polypeptides. The invention also relates to methods of use of Bolekine and its role in the immune system and cell differentiation.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Leukocytes include monocytes, macrophages, basophils, and eosinophils and play an important role in the immune response. These cells are important in the mechanisms initiated by T and/or B lymphocytes and secrete a range of cytokines which recruit and activate other inflammatory cells and contribute to tissue destruction.

15 Thus, investigation of the regulatory processes by which leukocytes move to their appropriate destination and interact with other cells is critical. Currently, leukocytes are thought to move from the blood to injured or inflamed tissues by rolling along the endothelial cells of the blood vessel wall. This movement is mediated by transient interactions between selectins and their ligands. Next, the leukocyte must move through the vessel wall and into the tissues. This diapedesis and extravasation step involves cell activation which promotes a more stable leukocyte-endothelial cell interaction, again mediated by integrins and their ligands.

20 Chemokines are a large family of structurally related polypeptide cytokines. These molecules stimulate leukocyte movement and may explain leukocyte trafficking in different inflammatory situations. Chemokines mediate the expression of particular adhesion molecules on endothelial cells, and they produce chemoattractants which activate specific cell types. In addition, the chemokines stimulate proliferation and regulate activation of specific cell types. In both of these activities, chemokines demonstrate a high degree of target cell specificity.

25 The chemokine family is divided into two subfamilies based on whether two amino terminal cysteine residues are immediately adjacent (C-C) or separated by one amino acid (C-X-C). Chemokines of the C-X-C family generally activate neutrophils and fibroblasts while the C-C chemokines act on a more diverse group of target cells including monocytes/macrophages, basophils, eosinophils and T lymphocytes. The known chemokines of both subfamilies are synthesized by many diverse cell types as reviewed in Thomson A. (1994) *The Cytokine Handbook*, 2 d Ed. Academic Press, N.Y. Chemokines are also reviewed in Schall TJ (1994) *Chemotactic Cytokines: Targets for Therapeutic Development*. International Business Communications, Southborough Mass. pp 180-270; and in Paul WE (1993) *Fundamental Immunology*, 3rd Ed. Raven Press, N.Y. pp 822-826.

30 Known chemokines of the C-X-C subfamily include macrophage inflammatory proteins alpha and beta (MIP-1 and MIP-2), interleukin-8 (IL-8), and growth regulated protein (GRO-alpha and beta).

MIP-2 was first identified as a 6 kDa heparin binding protein secreted by the mouse macrophage cell

WO 02/077028

PCT/US01/09552

line RAW 264.7 upon stimulation with lipopolysaccharide (LPS). MIP-2 is a member of the C-X-C (or CXC) subfamily of chemokines. Mouse MIP-2 is chemotactic for human neutrophils and induces local neutrophil infiltration when injected into the foot pads of mice. Rat MIP-2 shows 86% amino acid homology to the mouse MIP-2 and is chemotactic for rat neutrophils but does not stimulate migration of rat alveolar macrophages or human peripheral blood eosinophils or lymphocytes. In addition, the rat MIP-2 has been shown to stimulate proliferation of rat alveolar epithelial cells but not fibroblasts.

Current techniques for diagnosis of abnormalities in inflamed or diseased tissues mainly rely on observation of clinical symptoms or serological analyses of body tissues or fluids for hormones, polypeptides or various metabolites. Problems exist with these diagnostic techniques. First, patients may not manifest clinical symptoms at early stages of disease. Second, serological tests do not always differentiate between invasive diseases and genetic syndromes. Thus, the identification of expressed chemokines is important to the development of new diagnostic techniques, effective therapies, and to aid in the understanding of molecular pathogenesis.

To date, chemokines have been implicated in at least the following conditions: psoriasis, inflammatory bowel disease, renal disease, arthritis, immune-mediated alopecia, stroke, encephalitis, MS, hepatitis, and others. In addition, non-ELR-containing chemokines have been implicated in the inhibition of angiogenesis, thus indicating that these chemokines have a role in tumor vascularization and tumorigenesis.

Therefore it is the object of this invention to identify polypeptides and nucleic acids encoding the same which have sequence identity and similarity with cytokine-induced neutrophil chemoattractants, such as MIP-1, MIP-2, and other related proteins.

We herein describe the identification and characterization of novel chemokine family polypeptides, designated herein as Bolekine polypeptides.

SUMMARY OF THE INVENTION

In one embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that encodes a Bolekine polypeptide.

In one aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid

WO 02/077028

PCT/US01/09552

sequence identity to (a) a DNA molecule encoding a Bolekine polypeptide having a full-length amino acid sequence as disclosed herein, an amino acid sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a transmembrane protein, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

5 In other aspects, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87%
10 nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at
15 least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule comprising the coding sequence of a full-length Bolekine polypeptide cDNA as disclosed herein, the coding sequence of a Bolekine polypeptide lacking the signal peptide as disclosed herein, the coding sequence of an extracellular domain of a transmembrane Bolekine polypeptide, with or without
20 the signal peptide, as disclosed herein or the coding sequence of any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In a further aspect, the invention concerns an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83%
25 nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at
30 least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule that encodes the same mature
35 polypeptide encoded by any of the human protein cDNAs deposited with the ATCC as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

Another aspect the invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide

WO 02/077028

PCT/US01/09552

sequence encoding a Bolekine polypeptide which is either transmembrane domain-deleted or transmembrane domain-inactivated, or is complementary to such encoding nucleotide sequence, wherein the transmembrane domain(s) of such polypeptide are disclosed herein. Therefore, soluble extracellular domains of the herein described Bolekine polypeptides are contemplated.

5 Another embodiment is directed to fragments of a Bolekine polypeptide coding sequence, or the complement thereof, that may find use as, for example, hybridization probes, for encoding fragments of a Bolekine polypeptide that may optionally encode a polypeptide comprising a binding site for an anti-Bolekine antibody or as antisense oligonucleotide probes. Such nucleic acid fragments are usually at least about 10 nucleotides in length, alternatively at least about 15 nucleotides in length, alternatively at least about 20 nucleotides in length, alternatively at least about 30 nucleotides in length, alternatively at least about 40
10 nucleotides in length, alternatively at least about 50 nucleotides in length, alternatively at least about 60 nucleotides in length, alternatively at least about 70 nucleotides in length, alternatively at least about 80 nucleotides in length, alternatively at least about 90 nucleotides in length, alternatively at least about 100 nucleotides in length, alternatively at least about 110 nucleotides in length, alternatively at least about 120 nucleotides in length, alternatively at least about 130 nucleotides in length, alternatively at least about 140
15 nucleotides in length, alternatively at least about 150 nucleotides in length, alternatively at least about 160 nucleotides in length, alternatively at least about 170 nucleotides in length, alternatively at least about 180 nucleotides in length, alternatively at least about 190 nucleotides in length, alternatively at least about 200 nucleotides in length, alternatively at least about 250 nucleotides in length, alternatively at least about 300 nucleotides in length, alternatively at least about 350 nucleotides in length, alternatively at least about 400
20 nucleotides in length, alternatively at least about 450 nucleotides in length, alternatively at least about 500 nucleotides in length, alternatively at least about 600 nucleotides in length, alternatively at least about 700 nucleotides in length, alternatively at least about 800 nucleotides in length, alternatively at least about 900 nucleotides in length and alternatively at least about 1000 nucleotides in length, wherein in this context the term "about" means the referenced nucleotide sequence length plus or minus 10% of that referenced length. It is
25 noted that novel fragments of a Bolekine polypeptide-encoding nucleotide sequence may be determined in a routine manner by aligning the Bolekine polypeptide-encoding nucleotide sequence with other known nucleotide sequences using any of a number of well known sequence alignment programs and determining which Bolekine polypeptide-encoding nucleotide sequence fragment(s) are novel. All of such Bolekine polypeptide-encoding nucleotide sequences are contemplated herein. Also contemplated are the Bolekine polypeptide fragments
30 encoded by these nucleotide molecule fragments, preferably those Bolekine polypeptide fragments that comprise a binding site for an anti-Bolekine antibody.

In another embodiment, the invention provides isolated Bolekine polypeptide encoded by any of the isolated nucleic acid sequences hereinabove identified.

35 In a certain aspect, the invention concerns an isolated Bolekine polypeptide, comprising an amino acid sequence having at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81% amino acid sequence identity, alternatively at least about 82% amino acid sequence identity, alternatively at least about 83% amino acid sequence identity, alternatively at least about 84% amino acid sequence identity, alternatively at least

WO 02/077028

PCT/US01/09552

about 85% amino acid sequence identity, alternatively at least about 86% amino acid sequence identity, alternatively at least about 87% amino acid sequence identity, alternatively at least about 88% amino acid sequence identity, alternatively at least about 89% amino acid sequence identity, alternatively at least about 90% amino acid sequence identity, alternatively at least about 91% amino acid sequence identity, alternatively at least about 92% amino acid sequence identity, alternatively at least about 93% amino acid sequence identity, alternatively at least about 94% amino acid sequence identity, alternatively at least about 95% amino acid sequence identity, alternatively at least about 96% amino acid sequence identity, alternatively at least about 97% amino acid sequence identity, alternatively at least about 98% amino acid sequence identity and alternatively at least about 99% amino acid sequence identity to a Bolekine polypeptide having a full-length amino acid sequence as disclosed herein, an amino acid sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a transmembrane protein, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein.

In a further aspect, the invention concerns an isolated Bolekine polypeptide comprising an amino acid sequence having at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81% amino acid sequence identity, alternatively at least about 82% amino acid sequence identity, alternatively at least about 83% amino acid sequence identity, alternatively at least about 84% amino acid sequence identity, alternatively at least about 85% amino acid sequence identity, alternatively at least about 86% amino acid sequence identity, alternatively at least about 87% amino acid sequence identity, alternatively at least about 88% amino acid sequence identity, alternatively at least about 89% amino acid sequence identity, alternatively at least about 90% amino acid sequence identity, alternatively at least about 91% amino acid sequence identity, alternatively at least about 92% amino acid sequence identity, alternatively at least about 93% amino acid sequence identity, alternatively at least about 94% amino acid sequence identity, alternatively at least about 95% amino acid sequence identity, alternatively at least about 96% amino acid sequence identity, alternatively at least about 97% amino acid sequence identity, alternatively at least about 98% amino acid sequence identity and alternatively at least about 99% amino acid sequence identity to an amino acid sequence encoded by any of the human protein cDNAs deposited with the ATCC as disclosed herein.

In a specific aspect, the invention provides an isolated Bolekine polypeptide without the N-terminal signal sequence and/or the initiating methionine and is encoded by a nucleotide sequence that encodes such an amino acid sequence as hereinbefore described. Processes for producing the same are also herein described, wherein those processes comprise culturing a host cell comprising a vector which comprises the appropriate encoding nucleic acid molecule under conditions suitable for expression of the Bolekine polypeptide and recovering the Bolekine polypeptide from the cell culture.

Another aspect the invention provides an isolated Bolekine polypeptide which is either transmembrane domain-deleted or transmembrane domain-inactivated. Processes for producing the same are also herein described, wherein those processes comprise culturing a host cell comprising a vector which comprises the appropriate encoding nucleic acid molecule under conditions suitable for expression of the Bolekine polypeptide and recovering the Bolekine polypeptide from the cell culture.

In yet another embodiment, the invention concerns agonists and antagonists of a native Bolekine

WO 02/077028

PCT/US01/09552

polypeptide as defined herein. In a particular embodiment, the agonist or antagonist is an anti-Bolekin antibody or a small molecule.

In a further embodiment, the invention concerns a method of identifying agonists or antagonists to a Bolekin polypeptide which comprise contacting the Bolekin polypeptide with a candidate molecule and monitoring a biological activity mediated by said Bolekin polypeptide. Preferably, the Bolekin polypeptide is a native Bolekin polypeptide.

In a still further embodiment, the invention concerns a composition of matter comprising a Bolekin polypeptide, or an agonist or antagonist of a Bolekin polypeptide as herein described, or an anti-Bolekin antibody, in combination with a carrier. Optionally, the carrier is a pharmaceutically acceptable carrier.

Another embodiment of the present invention is directed to the use of a Bolekin polypeptide, or an agonist or antagonist thereof as hereinbefore described, or an anti-Bolekin antibody, for the preparation of a medicament useful in the treatment of a condition which is responsive to the Bolekin polypeptide, an agonist or antagonist thereof or an anti-Bolekin antibody.

In other embodiments of the present invention, the invention provides vectors comprising DNA encoding any of the herein described polypeptides. Host cell comprising any such vector are also provided. By way of example, the host cells may be CHO cells, *E. coli*, or yeast. A process for producing any of the herein described polypeptides is further provided and comprises culturing host cells under conditions suitable for expression of the desired polypeptide and recovering the desired polypeptide from the cell culture.

In other embodiments, the invention provides chimeric molecules comprising any of the herein described polypeptides fused to a heterologous polypeptide or amino acid sequence. Example of such chimeric molecules comprise any of the herein described polypeptides fused to an epitope tag sequence or a Fc region of an immunoglobulin.

In another embodiment, the invention provides an antibody which binds, preferably specifically, to any of the above or below described polypeptides. Optionally, the antibody is a monoclonal antibody, humanized antibody, antibody fragment or single-chain antibody.

In yet other embodiments, the invention provides oligonucleotide probes which may be useful for isolating genomic and cDNA nucleotide sequences, measuring or detecting expression of an associated gene or as antisense probes, wherein those probes may be derived from any of the above or below described nucleotide sequences. Preferred probe lengths are described above.

In yet other embodiments, the present invention is directed to methods of using the Bolekin polypeptides of the present invention for a variety of uses based upon the functional biological assay data presented in the Examples below.

In yet other embodiments the invention is directed to methods that will increase the proliferation of immune cells such as presented in Example 10.

In yet other embodiments the invention is directed to methods of use of increasing vascular permeability such as presented in Example 11.

WO 02/077028

PCT/US01/09552

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:1) of a native sequence Bolekine cDNA, wherein SEQ ID NO:1 is a clone designated herein as Bolekine.

Figure 2 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:2) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:1 shown in Figure 1.

5 Figure 3 depicts the results of Northern blots analyzing the nucleic acid encoding Bolekine.

Figures 4A through 4E are photomicrographs depicting the results of in situ hybridization assays performed on the nucleic acid encoding Bolekine. Figure 4A depicts fetal skin, in the right frame is dark field microscopy, displaying the in situ, in the left frame is normal bright field microscopy. Figure 4B depicts fetal kidney, in the right frame is dark field microscopy, displaying the in situ, in the left frame is normal bright field microscopy. Figure 4C depicts fetal gut, in the right frame is dark field microscopy, displaying the in situ, in the left frame is normal bright field microscopy. Figure 4D depicts adult gut, in the right frame is dark field microscopy, displaying the in situ, in the left frame is normal bright field microscopy. Figure 4E depicts cerebrum, in the right frame is dark field microscopy, displaying the in situ, in the left frame is normal bright field microscopy.

15

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTSI. Definitions

The terms "Bolekine" as used herein encompass native sequence polypeptides and polypeptide variants (which are further defined herein). The Bolekine polypeptides described herein may be isolated from a variety of sources, such as from human tissue types or from another source, or prepared by recombinant or synthetic methods. The term "Bolekine polypeptide" refers to each individual Bolekine polypeptide disclosed herein. All disclosures in this specification which refer to the "Bolekine polypeptide" refer to each of the polypeptides individually as well as jointly. For example, descriptions of the preparation of, purification of, derivation of, formation of antibodies to or against, administration of, compositions containing, treatment of a disease with, etc., pertain to each polypeptide of the invention individually. The term "Bolekine polypeptide" also includes variants of the Bolekine polypeptides disclosed herein.

A "native sequence Bolekine polypeptide" comprises a polypeptide having the same amino acid sequence as the corresponding Bolekine polypeptide derived from nature. Such native sequence Bolekine polypeptides can be isolated from nature or can be produced by recombinant or synthetic means. The term "native sequence Bolekine polypeptide" specifically encompasses naturally-occurring truncated or secreted forms of the specific Bolekine polypeptide (*e.g.*, an extracellular domain sequence), naturally-occurring variant forms (*e.g.*, alternatively spliced forms) and naturally-occurring allelic variants of the polypeptide. In various embodiments of the invention, the native sequence Bolekine polypeptides disclosed herein are mature or full-length native sequence polypeptides comprising the full-length amino acids sequences shown in the accompanying figures. Start and stop codons are shown in bold font and underlined in the figures. However, while the Bolekine polypeptide disclosed in the accompanying figures are shown to begin with methionine residues designated herein as amino acid position 1 in the figures, it is conceivable and possible that other methionine residues located either

WO 02/077028

PCT/US01/09552

upstream or downstream from the amino acid position 1 in the figures may be employed as the starting amino acid residue for the Bolekine polypeptides.

The Bolekine polypeptide "extracellular domain" or "ECD" refers to a form of the Bolekine polypeptide which is essentially free of the transmembrane and cytoplasmic domains. Ordinarily, a Bolekine polypeptide ECD will have less than 1% of such transmembrane and/or cytoplasmic domains and preferably, will have less than 0.5% of such domains. It will be understood that any transmembrane domains identified for the Bolekine polypeptides of the present invention are identified pursuant to criteria routinely employed in the art for identifying that type of hydrophobic domain. The exact boundaries of a transmembrane domain may vary but most likely by no more than about 5 amino acids at either end of the domain as initially identified herein. Optionally, therefore, an extracellular domain of a Bolekine polypeptide may contain from about 5 or fewer amino acids on either side of the transmembrane domain/extracellular domain boundary as identified in the Examples or specification and such polypeptides, with or without the associated signal peptide, and nucleic acid encoding them, are contemplated by the present invention.

The approximate location of the "signal peptides" of the various Bolekine polypeptides disclosed herein are shown in the present specification and/or the accompanying figures. It is noted, however, that the C-terminal boundary of a signal peptide may vary, but most likely by no more than about 5 amino acids on either side of the signal peptide C-terminal boundary as initially identified herein, wherein the C-terminal boundary of the signal peptide may be identified pursuant to criteria routinely employed in the art for identifying that type of amino acid sequence element (e.g., Nielsen et al., *Prot. Eng.*, 10:1-6 (1997) and von Heinje et al., *Nucl. Acids. Res.* 14:4683-4690 (1986)). Moreover, it is also recognized that, in some cases, cleavage of a signal sequence from a secreted polypeptide is not entirely uniform, resulting in more than one secreted species. These mature polypeptides, where the signal peptide is cleaved within no more than about 5 amino acids on either side of the C-terminal boundary of the signal peptide as identified herein, and the polynucleotides encoding them, are contemplated by the present invention.

"Bolekine polypeptide variant" means an active Bolekine polypeptide as defined above or below having at least about 80% amino acid sequence identity with a full-length native sequence Bolekine polypeptide sequence as disclosed herein, a Bolekine polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a Bolekine polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other fragment of a full-length Bolekine polypeptide sequence as disclosed herein. Such Bolekine polypeptide variants include, for instance, Bolekine polypeptides wherein one or more amino acid residues are added, or deleted, at the N- or C-terminus of the full-length native amino acid sequence. Ordinarily, a Bolekine polypeptide variant will have at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81% amino acid sequence identity, alternatively at least about 82% amino acid sequence identity, alternatively at least about 83% amino acid sequence identity, alternatively at least about 84% amino acid sequence identity, alternatively at least about 85% amino acid sequence identity, alternatively at least about 86% amino acid sequence identity, alternatively at least about 87% amino acid sequence identity, alternatively at least about 88% amino acid sequence identity, alternatively at least about 89% amino acid sequence identity, alternatively at least about 90% amino acid sequence identity, alternatively at least about 91% amino acid sequence identity,

WO 02/077028

PCT/US01/09552

alternatively at least about 92% amino acid sequence identity, alternatively at least about 93% amino acid sequence identity, alternatively at least about 94% amino acid sequence identity, alternatively at least about 95% amino acid sequence identity, alternatively at least about 96% amino acid sequence identity, alternatively at least about 97% amino acid sequence identity, alternatively at least about 98% amino acid sequence identity and
5 alternatively at least about 99% amino acid sequence identity to a full-length native sequence Bolekine polypeptide sequence as disclosed herein, a Bolekine polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a Bolekine polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of a full-length Bolekine polypeptide sequence as disclosed herein. Ordinarily, Bolekine variant polypeptides are at least about 10 amino acids in length, alternatively at least about 20 amino acids in length, alternatively at least about 30 amino acids in length, alternatively at least about 40
10 amino acids in length, alternatively at least about 50 amino acids in length, alternatively at least about 60 amino acids in length, alternatively at least about 70 amino acids in length, alternatively at least about 80 amino acids in length, alternatively at least about 90 amino acids in length, alternatively at least about 100 amino acids in length, alternatively at least about 150 amino acids in length, alternatively at least about 200 amino acids in length, alternatively at least about 300 amino acids in length, or more.

15 "Percent (%) amino acid sequence identity" with respect to the Bolekine polypeptide sequences identified herein is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in the specific Bolekine polypeptide sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino
20 acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % amino acid sequence identity values are generated using the sequence comparison computer
25 program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table 1 below. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and the source code shown in Table 1 below has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source
30 code provided in Table 1 below. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

In situations where ALIGN-2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which
35 can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

WO 02/077028

PCT/US01/09552

100 times the fraction X/Y

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A. As examples of % amino acid sequence identity calculations using this method, Tables 2 and 3 demonstrate how to calculate the % amino acid sequence identity of the amino acid sequence designated "Comparison Protein" to the amino acid sequence designated "Bolekine", wherein "Bolekine" represents the amino acid sequence of a hypothetical Bolekine polypeptide of interest, "Comparison Protein" represents the amino acid sequence of a polypeptide against which the "Bolekine" polypeptide of interest is being compared, and "X," "Y" and "Z" each represent different hypothetical amino acid residues.

Unless specifically stated otherwise, all % amino acid sequence identity values used herein are obtained as described in the immediately preceding paragraph using the ALIGN-2 computer program. However, % amino acid sequence identity values may also be obtained as described below by using the WU-BLAST-2 computer program (Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). Most of the WU-BLAST-2 search parameters are set to the default values. Those not set to default values, i.e., the adjustable parameters, are set with the following values: overlap span = 1, overlap fraction = 0.125, word threshold (T) = 11, and scoring matrix = BLOSUM62. When WU-BLAST-2 is employed, a % amino acid sequence identity value is determined by dividing (a) the number of matching identical amino acid residues between the amino acid sequence of the Bolekine polypeptide of interest having a sequence derived from the native Bolekine polypeptide and the comparison amino acid sequence of interest (i.e., the sequence against which the Bolekine polypeptide of interest is being compared which may be a Bolekine variant polypeptide) as determined by WU-BLAST-2 by (b) the total number of amino acid residues of the Bolekine polypeptide of interest. For example, in the statement "a polypeptide comprising an the amino acid sequence A which has or having at least 80% amino acid sequence identity to the amino acid sequence B", the amino acid sequence A is the comparison amino acid sequence of interest and the amino acid sequence B is the amino acid sequence of the Bolekine polypeptide of interest.

Percent amino acid sequence identity may also be determined using the sequence comparison program NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). The NCBI-BLAST2 sequence comparison program may be downloaded from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> or otherwise obtained from the National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 uses several search parameters, wherein all of those search parameters are set to default values including, for example, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 and scoring matrix = BLOSUM62.

In situations where NCBI-BLAST2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino

WO 02/077028

PCT/US01/09552

acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

100 times the fraction X/Y

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program NCBI-BLAST2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A.

"Bolekin variant polynucleotide" or "Bolekin variant nucleic acid sequence" means a nucleic acid molecule which encodes an active Bolekin polypeptide as defined below and which has at least about 80% nucleic acid sequence identity with a nucleotide acid sequence encoding a full-length native sequence Bolekin polypeptide sequence as disclosed herein, a full-length native sequence Bolekin polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a Bolekin polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other fragment of a full-length Bolekin polypeptide sequence as disclosed herein. Ordinarily, a Bolekin variant polynucleotide will have at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity with a nucleic acid sequence encoding a full-length native sequence Bolekin polypeptide sequence as disclosed herein, a full-length native sequence Bolekin polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a Bolekin polypeptide, with or without the signal sequence, as disclosed herein or any other fragment of a full-length Bolekin polypeptide sequence as disclosed herein. Variants do not encompass the native nucleotide sequence.

Ordinarily, Bolekin variant polynucleotides are at least about 30 nucleotides in length, alternatively at least about 60 nucleotides in length, alternatively at least about 90 nucleotides in length, alternatively at least about 120 nucleotides in length, alternatively at least about 150 nucleotides in length, alternatively at least about 180 nucleotides in length, alternatively at least about 210 nucleotides in length, alternatively at least about 240 nucleotides in length, alternatively at least about 270 nucleotides in length, alternatively at least about 300 nucleotides in length, alternatively at least about 450 nucleotides in length, alternatively at least about 600

WO 02/077028

PCT/US01/09552

nucleotides in length, alternatively at least about 900 nucleotides in length, or more.

"Percent (%) nucleic acid sequence identity" with respect to Bolekine-encoding nucleic acid sequences identified herein is defined as the percentage of nucleotides in a candidate sequence that are identical with the nucleotides in the Bolekine nucleic acid sequence of interest, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. Alignment for purposes of determining percent nucleic acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN or Megalign (DNASTAR) software. For purposes herein, however, % nucleic acid sequence identity values are generated using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table 1 below. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and the source code shown in Table 1 below has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in Table 1 below. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

In situations where ALIGN-2 is employed for nucleic acid sequence comparisons, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D) is calculated as follows:

20

$$100 \text{ times the fraction } W/Z$$

where W is the number of nucleotides scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of C and D, and where Z is the total number of nucleotides in D. It will be appreciated that where the length of nucleic acid sequence C is not equal to the length of nucleic acid sequence D, the % nucleic acid sequence identity of C to D will not equal the % nucleic acid sequence identity of D to C. As examples of % nucleic acid sequence identity calculations, Tables 4 and 5, demonstrate how to calculate the % nucleic acid sequence identity of the nucleic acid sequence designated "Comparison DNA" to the nucleic acid sequence designated "Bolekine-DNA", wherein "Bolekine-DNA" represents a hypothetical Bolekine-encoding nucleic acid sequence of interest, "Comparison DNA" represents the nucleotide sequence of a nucleic acid molecule against which the "Bolekine-DNA" nucleic acid molecule of interest is being compared, and "N", "L" and "V" each represent different hypothetical nucleotides.

Unless specifically stated otherwise, all % nucleic acid sequence identity values used herein are obtained as described in the immediately preceding paragraph using the ALIGN-2 computer program. However, % nucleic acid sequence identity values may also be obtained as described below by using the WU-BLAST-2 computer program (Altschul et al., *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)). Most of the WU-BLAST-2 search parameters are set to the default values. Those not set to default values, i.e., the adjustable parameters,

35

WO 02/077028

PCT/US01/09552

are set with the following values: overlap span = 1, overlap fraction = 0.125, word threshold (T) = 11, and scoring matrix = BLOSUM62. When WU-BLAST-2 is employed, a % nucleic acid sequence identity value is determined by dividing (a) the number of matching identical nucleotides between the nucleic acid sequence of the Bolekine polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest having a sequence derived from the native sequence Bolekine polypeptide-encoding nucleic acid and the comparison nucleic acid molecule of interest (i.e., the sequence against which the Bolekine polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest is being compared which may be a variant Bolekine polynucleotide) as determined by WU-BLAST-2 by (b) the total number of nucleotides of the Bolekine polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest. For example, in the statement "an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence A which has or having at least 80% nucleic acid sequence identity to the nucleic acid sequence B", the nucleic acid sequence A is the comparison nucleic acid molecule of interest and the nucleic acid sequence B is the nucleic acid sequence of the Bolekine polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest.

Percent nucleic acid sequence identity may also be determined using the sequence comparison program NCBI-BLAST2 (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1997)). The NCBI-BLAST2 sequence comparison program may be downloaded from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> or otherwise obtained from the National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 uses several search parameters, wherein all of those search parameters are set to default values including, for example, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 and scoring matrix = BLOSUM62.

In situations where NCBI-BLAST2 is employed for sequence comparisons, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } W/Z$$

where W is the number of nucleotides scored as identical matches by the sequence alignment program NCBI-BLAST2 in that program's alignment of C and D, and where Z is the total number of nucleotides in D. It will be appreciated that where the length of nucleic acid sequence C is not equal to the length of nucleic acid sequence D, the % nucleic acid sequence identity of C to D will not equal the % nucleic acid sequence identity of D to C.

In other embodiments, Bolekine variant polynucleotides are nucleic acid molecules that encode an active Bolekine polypeptide and which are capable of hybridizing, preferably under stringent hybridization and wash conditions, to nucleotide sequences encoding a full-length Bolekine polypeptide as disclosed herein. Bolekine variant polypeptides may be those that are encoded by a Bolekine variant polynucleotide.

"Isolated," when used to describe the various polypeptides disclosed herein, means polypeptide that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials that would typically interfere with diagnostic or therapeutic

WO 02/077028

PCT/US01/09552

uses for the polypeptide, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous solutes. In preferred embodiments, the polypeptide will be purified (1) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (2) to homogeneity by SDS-PAGE under non-reducing or reducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated polypeptide includes polypeptide *in situ* within recombinant cells, since at least one component of the Bolekine polypeptide natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated polypeptide will be prepared by at least one purification step.

An "isolated" Bolekine polypeptide-encoding nucleic acid or other polypeptide-encoding nucleic acid is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the polypeptide-encoding nucleic acid. An isolated polypeptide-encoding nucleic acid molecule is other than in the form or setting in which it is found in nature. Isolated polypeptide-encoding nucleic acid molecules therefore are distinguished from the specific polypeptide-encoding nucleic acid molecule as it exists in natural cells. However, an isolated polypeptide-encoding nucleic acid molecule includes polypeptide-encoding nucleic acid molecules contained in cells that ordinarily express the polypeptide where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

The term "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers, for example, single anti-Bolekine monoclonal antibodies (including agonist, antagonist, and neutralizing antibodies), anti-Bolekine antibody compositions with polyepitopic specificity, single chain anti-Bolekine antibodies, and fragments of anti-Bolekine antibodies (see below). The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally-occurring mutations that may be present in minor amounts.

"Stringency" of hybridization reactions is readily determinable by one of ordinary skill in the art, and generally is an empirical calculation dependent upon probe length, washing temperature, and salt concentration. In general, longer probes require higher temperatures for proper annealing, while shorter probes need lower

WO 02/077028

PCT/US01/09552

temperatures. Hybridization generally depends on the ability of denatured DNA to reanneal when complementary strands are present in an environment below their melting temperature. The higher the degree of desired homology between the probe and hybridizable sequence, the higher the relative temperature which can be used. As a result, it follows that higher relative temperatures would tend to make the reaction conditions more stringent, while lower temperatures less so. For additional details and explanation of stringency of hybridization reactions, see Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Stringent conditions" or "high stringency conditions", as defined herein, may be identified by those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42°C; or (3) employ 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55°C, followed by a high-stringency wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55°C.

"Moderately stringent conditions" may be identified as described by Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, and include the use of washing solution and hybridization conditions (e.g., temperature, ionic strength and %SDS) less stringent than those described above. An example of moderately stringent conditions is overnight incubation at 37°C in a solution comprising: 20% formamide, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5 x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 mg/ml denatured sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 1 x SSC at about 37-50°C. The skilled artisan will recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc. as necessary to accommodate factors such as probe length and the like.

The term "epitope tagged" when used herein refers to a chimeric polypeptide comprising a Bolekine polypeptide fused to a "tag polypeptide". The tag polypeptide has enough residues to provide an epitope against which an antibody can be made, yet is short enough such that it does not interfere with activity of the polypeptide to which it is fused. The tag polypeptide preferably also is fairly unique so that the antibody does not substantially cross-react with other epitopes. Suitable tag polypeptides generally have at least six amino acid residues and usually between about 8 and 50 amino acid residues (preferably, between about 10 and 20 amino acid residues).

As used herein, the term "immunoadhesin" designates antibody-like molecules which combine the binding specificity of a heterologous protein (an "adhesin") with the effector functions of immunoglobulin constant domains. Structurally, the immunoadhesins comprise a fusion of an amino acid sequence with the desired binding specificity which is other than the antigen recognition and binding site of an antibody (i.e., is "heterologous"), and an immunoglobulin constant domain sequence. The adhesin part of an immunoadhesin molecule typically is a contiguous amino acid sequence comprising at least the binding site of a receptor or a

WO 02/077028

PCT/US01/09552

ligand. The immunoglobulin constant domain sequence in the immunoadhesin may be obtained from any immunoglobulin, such as IgG-1, IgG-2, IgG-3, or IgG-4 subtypes, IgA (including IgA-1 and IgA-2), IgE, IgD or IgM.

5 "Active" or "activity" for the purposes herein refers to form(s) of a Bolekine polypeptide which retain a biological and/or an immunological activity of native or naturally-occurring Bolekine, wherein "biological" activity refers to a biological function (either inhibitory or stimulatory) caused by a native or naturally-occurring Bolekine other than the ability to induce the production of an antibody against an antigenic epitope possessed by a native or naturally-occurring Bolekine and an "immunological" activity refers to the ability to induce the production of an antibody against an antigenic epitope possessed by a native or naturally-occurring Bolekine.

10 The term "antagonist" is used in the broadest sense, and includes any molecule that partially or fully blocks, inhibits, or neutralizes a biological activity of a native Bolekine polypeptide disclosed herein. In a similar manner, the term "agonist" is used in the broadest sense and includes any molecule that mimics a biological activity of a native Bolekine polypeptide disclosed herein. Suitable agonist or antagonist molecules specifically include agonist or antagonist antibodies or antibody fragments, fragments or amino acid sequence variants of native Bolekine polypeptides, peptides, antisense oligonucleotides, small organic molecules, etc.

15 Methods for identifying agonists or antagonists of a Bolekine polypeptide may comprise contacting a Bolekine polypeptide with a candidate agonist or antagonist molecule and measuring a detectable change in one or more biological activities normally associated with the Bolekine polypeptide.

"Treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures, wherein the object is to prevent or slow down (lessen) the targeted pathologic condition or disorder. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those prone to have the disorder or those in whom the disorder is to be prevented.

20

"Chronic" administration refers to administration of the agent(s) in a continuous mode as opposed to an acute mode, so as to maintain the initial therapeutic effect (activity) for an extended period of time. "Intermittent" administration is treatment that is not consecutively done without interruption, but rather is cyclic in nature.

25

"Mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as dogs, cats, cattle, horses, sheep, pigs, goats, rabbits, etc. Preferably, the mammal is human.

Administration "in combination with" one or more further therapeutic agents includes simultaneous (concurrent) and consecutive administration in any order.

30

"Carriers" as used herein include pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers which are nontoxic to the cell or mammal being exposed thereto at the dosages and concentrations employed. Often the physiologically acceptable carrier is an aqueous pH buffered solution. Examples of physiologically acceptable carriers include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptide; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including

35

WO 02/077028

PCT/US01/09552

glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEEN[®], polyethylene glycol (PEG), and PLURONICS[™].

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably the antigen binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies (Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, a designation reflecting the ability to crystallize readily. Pepsin treatment yields an F(ab')₂ fragment that has two antigen-combining sites and is still capable of cross-linking antigen.

"Fv" is the minimum antibody fragment which contains a complete antigen-recognition and -binding site. This region consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable domain in tight, non-covalent association. It is in this configuration that the three CDRs of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the V_H-V_L dimer. Collectively, the six CDRs confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH1) of the heavy chain. Fab fragments differ from Fab' fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group. F(ab')₂ antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

The "light chains" of antibodies (immunoglobulins) from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa and lambda, based on the amino acid sequences of their constant domains.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgA2.

"Single-chain Fv" or "sFv" antibody fragments comprise the V_H and V_L domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Preferably, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V_H and V_L domains which enables the sFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of sFv, see Ptuckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain variable domain (V_L) in the

WO 02/077028

PCT/US01/09552

same polypeptide chain (V_H - V_L). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; and Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

5 An "isolated" antibody is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody in situ within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

10 An antibody that "specifically binds to" or is "specific for" a particular polypeptide or an epitope on a particular polypeptide is one that binds to that particular polypeptide or epitope on a particular polypeptide without substantially binding to any other polypeptide or polypeptide epitope.

The word "label" when used herein refers to a detectable compound or composition which is conjugated directly or indirectly to the antibody so as to generate a "labeled" antibody. The label may be detectable by itself (e.g. radioisotope labels or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration of a substrate compound or composition which is detectable.

20 By "solid phase" is meant a non-aqueous matrix to which the antibody of the present invention can adhere. Examples of solid phases encompassed herein include those formed partially or entirely of glass (e.g., controlled pore glass), polysaccharides (e.g., agarose), polyacrylamides, polystyrene, polyvinyl alcohol and silicones. In certain embodiments, depending on the context, the solid phase can comprise the well of an assay plate; in others it is a purification column (e.g., an affinity chromatography column). This term also includes a discontinuous solid phase of discrete particles, such as those described in U.S. Patent No. 4,275,149.

25 A "liposome" is a small vesicle composed of various types of lipids, phospholipids and/or surfactant which is useful for delivery of a drug (such as a Bolekine polypeptide or antibody thereto) to a mammal. The components of the liposome are commonly arranged in a bilayer formation, similar to the lipid arrangement of biological membranes.

A "small molecule" is defined herein to have a molecular weight below about 500 Daltons.

30 An "effective amount" of a polypeptide disclosed herein or an agonist or antagonist thereof is an amount sufficient to carry out a specifically stated purpose. An "effective amount" may be determined empirically and in a routine manner, in relation to the stated purpose.

35 A "pluripotent cell" is defined herein as a cell that is not fixed to a developmental lineage.

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1

```

/*
*
* C-C increased from 12 to 15
* Z is average of EQ
5 * B is average of ND
* match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
*/
#define _M -8 /* value of a match with a stop */

10 int _day[26][26] = {
/* A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ {2,0,-2,0,0,-4,1,-1,-1,0,-1,-2,-1,0,_M,1,0,-2,1,1,0,0,-6,0,-3,0},
/* B */ {0,3,-4,3,2,-5,0,1,-2,0,0,-3,-2,2,_M,-1,1,0,0,0,-2,-5,0,-3,-1},
/* C */ {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2,0,5,-6,-5,-4,_M,-3,5,-4,0,-2,0,-2,-8,0,0,-5},
15 /* D */ {0,3,-5,4,3,-6,1,1,-2,0,0,-4,-3,2,_M,-1,2,-1,0,0,0,-2,-7,0,-4,-2},
/* E */ {0,2,-5,3,4,-5,0,1,-2,0,0,-3,-2,1,_M,-1,2,-1,0,0,0,-2,-7,0,-4,-3},
/* F */ {-4,-5,-4,-6,-5,9,-5,-2,1,0,-5,2,0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3,0,-1,0,7,-5},
/* G */ {1,0,-3,1,0,-5,5,-2,-3,0,-2,-4,-3,0,_M,-1,-1,-3,1,0,0,-1,-7,0,-5,0},
/* H */ {-1,1,-3,1,1,-2,-2,6,-2,0,0,-2,-2,2,_M,0,3,2,-1,-1,0,-2,-3,0,0,2},
20 /* I */ {-1,-2,-2,-2,1,-3,-2,5,0,-2,2,2,-2,_M,-2,-2,-2,-1,0,0,4,-5,0,-1,-2},
/* J */ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* K */ {-1,0,-5,0,0,-5,-2,0,-2,0,5,-3,0,1,_M,-1,1,3,0,0,0,-2,-3,0,-4,0},
/* L */ {-2,-3,-6,-4,-3,2,-4,-2,2,0,-3,6,4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1,0,2,-2,0,-1,-2},
/* M */ {-1,-2,-5,-3,-2,0,-3,2,2,0,0,4,6,-2,_M,-2,-1,0,-2,-1,0,2,-4,0,-2,-1},
25 /* N */ {0,2,-4,2,1,-4,0,2,-2,0,1,-3,-2,2,_M,-1,1,0,1,0,0,-2,-4,0,-2,-1},
/* O */ {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */ {1,-1,-3,-1,-1,-5,-1,0,-2,0,-1,-3,-2,-1,_M,6,0,0,1,0,0,-1,-6,0,-5,0},
/* Q */ {0,1,-5,2,2,-5,-1,3,-2,0,1,-2,-1,1,_M,0,4,1,-1,0,-2,-5,0,-4,-3},
/* R */ {-2,0,-4,-1,-1,-4,3,2,-2,0,3,-3,0,0,_M,0,1,6,0,-1,0,-2,2,0,-4,0},
30 /* S */ {1,0,0,0,0,-3,1,-1,-1,0,0,-3,-2,1,_M,1,-1,0,2,1,0,-1,-2,0,-3,0},
/* T */ {1,0,-2,0,0,-3,0,-1,0,0,0,-1,-1,0,_M,0,-1,-1,1,3,0,0,-5,0,-3,0},
/* U */ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* V */ {0,-2,-2,-2,-1,-1,-2,4,0,-2,2,2,-2,_M,-1,-2,-2,-1,0,0,4,-6,0,-2,-2},
35 /* W */ {-6,-5,-8,-7,-7,0,-7,-3,-5,0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5,-2,-2,-5,0,-6,17,0,0,-6},
/* X */ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* Y */ {-3,-3,0,-4,-4,7,-5,0,-1,0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3,0,-2,0,0,10,-4},
/* Z */ {0,1,-5,2,3,-5,0,2,-2,0,0,-2,-1,1,_M,0,3,0,0,0,0,-2,-6,0,-4,4}
};

```

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont')

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>
5
#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max jmps in a path */
10 #define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */
#define DINSO 8 /* penalty for a gap */
15 #define DINSI 1 /* penalty per base */
#define PINSO 8 /* penalty for a gap */
#define PINSI 4 /* penalty per residue */

struct jmp {
20     short n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for del) */
     unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 - 1 */

struct diag {
25     int score; /* score at last jmp */
     long offset; /* offset of prev block */
     short jmp; /* current jmp index */
     struct jmp jp; /* list of jmps */
};

30 struct path {
     int spc; /* number of leading spaces */
     short n[JMPS]; /* size of jmp (gap) */
     int x[JMPS]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

35 char *ofile; /* output file name */
char *name[2]; /* seq names: getseqs() */
char *prog; /* prog name for err msgs */
40 int *seq[2]; /* seqs: getseqs() */
int dmax; /* best diag: mw() */
int dmax0; /* final diag */
int dna; /* set if dna: main() */
int endgaps; /* set if penalizing end gaps */
45 int gaps, gapy; /* total gaps in seqs */
int len0, len1; /* seq lens */
int ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int smax; /* max score: mw() */
int *xbm; /* bitmap for matching */
50 long offset; /* current offset in jmp file */
struct diag *dx; /* holds diagonals */
struct path *pp[2]; /* holds path for seqs */

char *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
55 char *getseq(), *g_calloc();

```

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont')

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: prog file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
5 * The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
10 *
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
15 #include "day.h"

static _dbval[26] = {
1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
20 1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
25 1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)                                main
30     int    ac;
     char   *av[];
{
     prog = av[0];
     if (ac == 3) {
35         fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
         fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
         fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
         fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored\n");
         fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
         exit(1);
40     }
     names[0] = av[1];
     names[1] = av[2];
     seqs[0] = getseq(names[0], &len0);
     seqs[1] = getseq(names[1], &len1);
45     xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

     endgaps = 0;                /* 1 to penalize endgaps */
     ofile = "align.out";       /* output file */

50     nw();                      /* fill in the matrix, get the possible jumps */
     readjumps();              /* get the actual jumps */
     print();                   /* print stats, alignment */

55     cleanup();                /* unlink any tmp files */
}

```

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont')

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
5  * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
{
10  char      *px, *py;      /* seqs and ptrs */
    int      *ndely, *dely; /* keep track of dely */
    int      ndelx, delx;   /* keep track of delx */
    int      *tmp;         /* for swapping row0, row1 */
15  int      mis;          /* score for each type */
    int      ins0, ins1;   /* insertion penalties */
    register id;          /* diagonal index */
    register ij;          /* jmp index */
    register *col0, *col1; /* score for curr. last row */
    register xx, yy;      /* index into seqs */

20  dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
25  col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

30  smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
35  }
        col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
40  dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
45  for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
50  else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
55  col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
60

```

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont')

...llw

```

for (py = seqx[l], yy = 1; yy <= len1; py +=, yy +=) {
  mis = col0[yy-1];
  if (dna)
    mis += (xbrn["px-'A']&xbrn["py-'A']? DMAT : DMIS;
  else
    mis += _day["px-'A']["py-'A'];

  /* update penalty for del in x seq;
   * favor new del over ongoing del
   * ignore MAXGAP if weighting endgaps
   */
  if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else {
      dely[yy] -= ins1;
      ndely[yy]++;
    }
  } else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else
      ndely[yy]++;
  }

  /* update penalty for del in y seq;
   * favor new del over ongoing del
   */
  if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else {
      delx -= ins1;
      ndelx++;
    }
  } else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else
      ndelx++;
  }

  /* pick the maximum score; we're favoring
   * mis over any del and delx over dely
   */

```

55

60

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont')

...HW

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
5   else if (delx >= dely[yy]) {
        col1[yy] = delx;
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (dmax || (ndelx >= MAXJMP
10      && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejms(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
            dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
            dx[id].jp.x[ij] = xx;
            dx[id].score = delx;
        }
    }
    else {
        col1[yy] = dely[yy];
        ij = dx[id].ijmp;
25      if (dx[id].jp.n[0] && (dmax || (ndely[yy] >= MAXJMP
            && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejms(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
            dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
            dx[id].jp.x[ij] = xx;
            dx[id].score = dely[yy];
        }
        if (xx == len0 && yy < len1) {
            /* last col
            */
            if (endgaps)
                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
            if (col1[yy] > smax) {
                smax = col1[yy];
                dmax = id;
            }
        }
    }
    if (endgaps && xx < len0)
        col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
    if (col1[yy-1] > smax) {
        smax = col1[yy-1];
        dmax = id;
    }
    tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont')

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
5  * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
10 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

15 #include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

20 extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

25 print() print
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* cverlap */

    if ((fx = fopen(outfile, "w")) == 0) {
30 fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, outfile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "< first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "< second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
35 olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
40 pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
45 pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
50 lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
55 getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

60

```

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont')

```

5  /*
   * trace back the best path, count matches
   */
   static
   getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                               getmat
   {
       int      lx, ly; /* "core" (minus endgaps) */
       int      firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */
   {
       int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
       char     outx[32];
       double   pct;
       register n0, n1;
       register char *p0, *p1;

15  /* get total matches, score
       */
       i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
       p0 = seqx[0] + pp[1].spc; /* "core" (minus endgaps) */
       p1 = seqx[1] + pp[0].spc; /* leading trailing overlap */
       n0 = pp[1].spc + 1;
       n1 = pp[0].spc + 1;

       nm = 0;
       while (*p0 && *p1) {
25         if (siz0) {
             p1++;
             n1++;
             siz0--;
         }
         else if (siz1) {
30             p0++;
             n0++;
             siz1--;
         }
         else {
35             if (xbm[*p0-'A'] && xbm[*p1-'A'])
                 nm++;
             if (n0++ == pp[0].x[i0])
                 siz0 = pp[0].n[i0++];
40             if (n1++ == pp[1].x[i1])
                 siz1 = pp[1].n[i1++];
             p0++;
             p1++;
         }
45     }

       /* pct homology:
        * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
        * else, knock off overhangs and take shorter core
        */
       if (endgaps)
           lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
       else
           lx = (lx < ly)? lx : ly;
55     pct = 100.0*(double)nm/(double)lx;
       fprintf(lx, "\n");
       fprintf(lx, "%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
           nm, (nm == 1)? "" : "cs", lx, pct);
60

```

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont')

```

5      fprintf(x, "< gaps in first sequence: %d", gapx);
      if (gapx) {
          (void) sprintf(outr, "(%d %s%s)",
10             gapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "": "s");
          fprintf(x, "%s", outr);

          fprintf(x, "< gaps in second sequence: %d", gapy);
          if (gapy) {
              (void) sprintf(outr, "(%d %s%s)",
15             gapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "": "s");
              fprintf(x, "%s", outr);
          }
          if (dna)
              fprintf(x,
20             "\n< score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
              smax, DMAT, DMIS, DINSO, DINS1);
          else
              fprintf(x,
25             "\n< score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
              smax, PINSO, PINS1);
          if (endgaps)
              fprintf(x,
30             "< endgaps penalized, left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
              firstgap, (dna)? "base": "residue", (firstgap == 1)? "": "s",
              lastgap, (dna)? "base": "residue", (lastgap == 1)? "": "s");
          else
              fprintf(x, "< endgaps not penalized\n");
      }

      static nm;          /* matches in core -- for checking */
      static lmax;       /* lengths of stripped file names */
      static ij[2];      /* jmp index for a path */
      static ni[2];      /* number at start of current line */
      static si[2];      /* current elem number -- for gapping */
      static char *ps[2]; /* ptr to current element */
      static char *po[2]; /* ptr to next output char slot */
      static char out[2][P_LINEL]; /* output line */
      static char star[P_LINEL]; /* set by stars() */

      /* print alignment of described in struct path pp[]
      */
45     static
      pr_align()
      {
          int un;        /* char count */
          int more;
          register i;

          for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
              un = stripname(namex[i]);
              if (un > lmax)
55                 lmax = un;

              nc[i] = 1;
              ni[i] = 1;
              sz[i] = ij[i] = 0;
              ps[i] = seqx[i];
              po[i] = outr[i];
          }
60

```

...getmat

pr_align

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont')

```

5      for (nn = nm = 0, more = 1; more;) {
6          for (i = more = 0; i < 2; i++) {
7              /*
8               * do we have more of this sequence?
9               */
10             if (!ps[i])
11                 continue;
12
13             more++;
14
15             if (pp[i].spc) { /* leading space */
16                 *po[i]++ = ' ';
17                 pp[i].spc--;
18             }
19             else if (siz[i]) { /* in a gap */
20                 *po[i]++ = '-';
21                 siz[i]--;
22             }
23             else { /* we're putting a seq element
24                  */
25                 *po[i] = *ps[i];
26                 if (istower(*ps[i]))
27                     *ps[i] = toupper(*ps[i]);
28                 po[i]++;
29                 ps[i]++;
30
31                 /*
32                  * are we at next gap for this seq?
33                  */
34                 if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
35                     /*
36                      * we need to merge all gaps
37                      * at this location
38                      */
39                     siz[i] = pp[i].ni[i]++;
40                     while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
41                         siz[i] += pp[i].ni[i]++;
42                 }
43                 ni[i]++;
44             }
45             if (++nn == olen || !more && nn) {
46                 dumpblock();
47                 for (i = 0; i < 2; i++)
48                     po[i] = out[i];
49                 nn = 0;
50             }
51         }
52     }
53
54     /*
55     * dump a block of lines, including numbers, stars; pr_align()
56     */
57     static
58     dumpblock()
59     {
60         register i;
61         for (i = 0; i < 2; i++)
62             *po[i] = '\0';

```

...pr_align

dumpblock

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont')

```

5      (void) puts("\n", fx);
      for (i = 0; i < 2; i++) {
          if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
              if (i == 0)
                  nums(i);
              if (i == 0 && *out[1])
                  stars(i);
              putline(i);
              if (i == 0 && *out[1])
                  fprintf(fx, star);
              if (i == 1)
                  nums(i);
          }
      }
15  }
      /*
20  * put out a number line: dumpblock()
      */
      static
      nums(ix)
25  {
      int    ix;    /* index in out[] holding seq line */
      char   nline[P_LINE];
      register i, j;
      register char *pn, *px, *py;
30  for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
          *pn = ' ';
      for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
          if (*py == ' ' || *py == '-')
              *pn = ' ';
35  else {
              if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                  j = (i < 0)? -1 : i;
                  for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                      *px = j%10 + '0';
40  if (i < 0)
                      *px = '-';
              }
              else
                  *pn = ' ';
45  i++;
          }
      }
      *pn = '\0';
      nc[ix] = i;
50  for (pn = nline; *pn; pn++)
          (void) puts(*pn, fx);
      (void) puts("\n", fx);
  }
      /*
55  * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
      */
      static
      putline(ix)
60  int    ix;
      {

```

...dumpblock

nums

putline

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont')

```

...putline
5      int      i;
      register char *px;

      for (px = names[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
          (void) puts(px, fx);
      for (; i < lmax+P_SPC; i++)
          (void) puts(" ", fx);
10     /* these count from 1:
       * ni[] is current element (from 1)
       * nc[] is number at start of current line
       */
15     for (px = out[ix]; *px; px++)
          (void) puts("px&0x7F", fx);
          (void) puts("n", fx);
    }

20     /*
       * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]); dumpblock()
       */
      static
25     stars()
      {
          int      i;
          register char *p0, *p1, cx, *px;

30         if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *p0[0] == ' ') ||
            !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *p0[1] == ' '))
            return;
          px = star;
35         for (i = lmax+P_SPC; i--;)
            *px++ = ' ';

          for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
              if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
40                 if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                     cx = '*';
                     nm++;
                 }
                 else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
45                     cx = '!';
                 else
                     cx = ' ';
              }
              else
50                 cx = ' ';
            *px++ = cx;
          }
          *px++ = '\n';
55     }
}
60

```

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont.)

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
5 stripname(pn)                                stripname
   char *pn; /* file name (may be path) */
   {
   register char *px, *py;
10   py = 0;
   for (px = pn; *px; px++)
     if (*px == '/')
15     if (py)
       (void) strcpy(pn, py);
   return(strlen(pn));
   }
20
25
30
35
40
45
50
55
60
```

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont')

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * _calloc() -- calloc() with error checkin
5  * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>
10 char *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

15 int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
20 cleanup() cleanup
{
    int i;
    if (fj)
25     (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
30 char *
getseq(file, len) getseq
35 char *file; /* file name */
int *len; /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
45     fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
50     if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc(unsafe(tlen+6))) == 0) {
55     fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
60

```

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont')

```

5      py = pseq + 4;
      *len = flen;
      rewind(fp);

      while (fgets(line, 1024, fp)) {
10         if (*line == '=' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
            for (px = line; *px != '\n'; px++) {
                if (isupper(*px))
                    *py++ = *px;
                else if (islower(*px))
                    *py++ = toupper(*px);
                if (index("ATGCU",*(py-1)))
                    natgc++;
            }
            *py++ = '\0';
            *py = '\0';
            (void) fclose(fp);
            dna = natgc > (flen/3);
            return(pseq+4);
25     }

char *
g_alloc(msg, nx, sz)
char *msg; /* program, calling routine */
int nx, sz; /* number and size of elements */
30     {
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
35             fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
40     }

/*
 * get final jumps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjumps()
45     {
        int fd = -1;
        int siz, i0, i1;
        register i, j, xx;

50         if (!f) {
            (void) fclose(f);
            if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                cleanup(1);
55             }
        }
        for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++) {
            while (1) {
                for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
60

```

...getseq

g_alloc

readjumps

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont')

...readjumps

```

5         if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
            (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
            dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
        }
10        else
            break;
        }
        if (i >= JMPS) {
            fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment'n", prog);
            cleanup(1);
        }
15        if (j >= 0) {
            siz = dx[dmax].jp.n[j];
            xx = dx[dmax].jp.x[j];
            dmax += siz;
            if (siz < 0) { /* gap in second seq */
                pp[1].n[i1] = -siz;
                xx += siz;
                /* id = xx - yy + len1 - 1
                */
                pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
                gspy++;
                ngapy -= siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
            i1++;
        }
        else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
            pp[0].n[i0] = siz;
            pp[0].x[i0] = xx;
            gapx++;
            ngapx += siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
            i0++;
        }
40        }
        else
            break;
    }

45    /* reverse the order of jumps
    */
    for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
    }
50    for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
    }
55    if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
    if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
60    }
}

```

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 1 (cont')

```
/*  
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nwo  
 */  
5 writejumps(ix)                                writejumps  
  {  
    int ix;  
    char *mktemp0;  
10    if (!fj) {  
      if (mktemp(jname) < 0) {  
        fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);  
        cleanup(1);  
      }  
15      if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {  
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);  
        exit(1);  
      }  
20      (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);  
      (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);  
    }  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60
```

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 2

PRO	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Length = 15 amino acids)
Comparison Protein	XXXXXXXXYYYYYY	(Length = 12 amino acids)

5 % amino acid sequence identity =

(the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the PRO polypeptide) =

10 5 divided by 15 = 33.3%

Table 3

PRO	XXXXXXXXXXXX	(Length = 10 amino acids)
15 Comparison Protein	XXXXXXXXYYYYZZYZ	(Length = 15 amino acids)

% amino acid sequence identity =

20 (the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the PRO polypeptide) =

5 divided by 10 = 50%

Table 4

25 PRO-DNA	NNNNNNNNNNNN	(Length = 14 nucleotides)
Comparison DNA	NNNNNLLLLLLLLL	(Length = 16 nucleotides)

% nucleic acid sequence identity =

30 (the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of nucleotides of the PRO-DNA nucleic acid sequence) =

35 6 divided by 14 = 42.9%

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 5

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNN	(Length = 12 nucleotides)
Comparison DNA	NNNNLLLVV	(Length = 9 nucleotides)

5 % nucleic acid sequence identity =

(the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of nucleotides of the PRO-DNA nucleic acid sequence) =

10 4 divided by 12 = 33.3%

II. Compositions and Methods of the Invention

A. Full-Length Bolekine Polypeptides

15 The present invention provides newly identified and isolated nucleotide sequences encoding polypeptides referred to in the present application as Bolekine polypeptides. In particular, cDNAs encoding various Bolekine polypeptides have been identified and isolated, as disclosed in further detail in the Examples below. However, for sake of simplicity, in the present specification the protein encoded by the full length native nucleic acid molecules disclosed herein as well as all further native homologues and variants included in the foregoing definition of Bolekine, will be referred to as Bolekine, regardless of their origin or mode of preparation.

20 As disclosed in the Examples below, Bolekine cDNA clone has been deposited with the ATCC. The actual nucleotide sequences of those clones can readily be determined by the skilled artisan by sequencing of the deposited clone using routine methods in the art. The predicted amino acid sequence can be determined from the nucleotide sequence using routine skill. For the Bolekine polypeptides and encoding nucleic acids described herein, Applicants have identified what is believed to be the reading frame best identifiable with the sequence information available at the time.

B. Bolekine Polypeptide Variants

30 In addition to the full-length native sequence Bolekine polypeptides described herein, it is contemplated that Bolekine variants can be prepared. Bolekine variants can be prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the Bolekine DNA, and/or by synthesis of the desired Bolekine polypeptide. Those skilled in the art will appreciate that amino acid changes may alter post-translational processes of the Bolekine, such as changing the number or position of glycosylation sites or altering the membrane anchoring characteristics.

35 Variations in the native full-length sequence Bolekine or in various domains of the Bolekine described herein, can be made, for example, using any of the techniques and guidelines for conservative and non-conservative mutations set forth, for instance, in U.S. Patent No. 5,364,934. Variations may be a substitution, deletion or insertion of one or more codons encoding the Bolekine that results in a change in the amino acid sequence of the Bolekine as compared with the native sequence Bolekine. Optionally the variation is by

WO 02/077028

PCT/US01/09552

- substitution of at least one amino acid with any other amino acid in one or more of the domains of the Bolekine. Guidance in determining which amino acid residue may be inserted, substituted or deleted without adversely affecting the desired activity may be found by comparing the sequence of the Bolekine with that of homologous known protein molecules and minimizing the number of amino acid sequence changes made in regions of high homology. Amino acid substitutions can be the result of replacing one amino acid with another amino acid having similar structural and/or chemical properties, such as the replacement of a leucine with a serine, i.e., conservative amino acid replacements. Insertions or deletions may optionally be in the range of about 1 to 5 amino acids. The variation allowed may be determined by systematically making insertions, deletions or substitutions of amino acids in the sequence and testing the resulting variants for activity exhibited by the full-length or mature native sequence.
- 5
- 10 Bolekine polypeptide fragments are provided herein. Such fragments may be truncated at the N-terminus or C-terminus, or may lack internal residues, for example, when compared with a full length native protein. Certain fragments lack amino acid residues that are not essential for a desired biological activity of the Bolekine polypeptide.
- 15 Bolekine fragments may be prepared by any of a number of conventional techniques. Desired peptide fragments may be chemically synthesized. An alternative approach involves generating Bolekine fragments by enzymatic digestion, e.g., by treating the protein with an enzyme known to cleave proteins at sites defined by particular amino acid residues, or by digesting the DNA with suitable restriction enzymes and isolating the desired fragment. Yet another suitable technique involves isolating and amplifying a DNA fragment encoding a desired polypeptide fragment, by polymerase chain reaction (PCR). Oligonucleotides that define the desired
- 20 termini of the DNA fragment are employed at the 5' and 3' primers in the PCR. Preferably, Bolekine polypeptide fragments share at least one biological and/or immunological activity with the native Bolekine polypeptide disclosed herein.
- 25 In particular embodiments, conservative substitutions of interest are shown in Table 6 under the heading of preferred substitutions. If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated exemplary substitutions in Table 6, or as further described below in reference to amino acid classes, are introduced and the products screened.

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Table 6

	Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
5	Ala (A)	val; leu; ile	val
	Arg (R)	lys; gln; asn	lys
	Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
10	Asp (D)	glu	glu
	Cys (C)	ser	ser
	Gln (Q)	asn	asn
	Glu (E)	asp	asp
	Gly (G)	pro; ala	ala
15	His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
	Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
	Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
20	Lys (K)	arg; gln; asn	arg
	Met (M)	leu; phe; ile	leu
	Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
	Pro (P)	ala	ala
	Ser (S)	thr	thr
25	Thr (T)	ser	ser
	Trp (W)	tyr; phe	tyr
	Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
	Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu
30			

Substantial modifications in function or immunological identity of the Bolekine polypeptide are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

- (1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;
- (3) acidic: asp, glu;
- (4) basic: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and
- (6) aromatic: trp, tyr, phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class. Such substituted residues also may be introduced into the conservative substitution sites or, more preferably, into the remaining (non-conserved) sites.

The variations can be made using methods known in the art such as oligonucleotide-mediated (site-directed) mutagenesis, alanine scanning, and PCR mutagenesis. Site-directed mutagenesis [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], cassette mutagenesis [Wells et

WO 02/077028

PCT/US01/09552

al., Gene, 34:315 (1985)], restriction selection mutagenesis [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London Ser.A, 317:415 (1986)] or other known techniques can be performed on the cloned DNA to produce the Bolekine variant DNA.

5 Scanning amino acid analysis can also be employed to identify one or more amino acids along a contiguous sequence. Among the preferred scanning amino acids are relatively small, neutral amino acids. Such amino acids include alanine, glycine, serine, and cysteine. Alanine is typically a preferred scanning amino acid among this group because it eliminates the side-chain beyond the beta-carbon and is less likely to alter the main-chain conformation of the variant [Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]. Alanine is also typically preferred because it is the most common amino acid. Further, it is frequently found in both buried and exposed positions [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1
10 (1976)]. If alanine substitution does not yield adequate amounts of variant, an isoteric amino acid can be used.

C. Modifications of Bolekine

Covalent modifications of Bolekine are included within the scope of this invention. One type of covalent modification includes reacting targeted amino acid residues of a Bolekine polypeptide with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the N- or C- terminal residues of the Bolekine. Derivatization with bifunctional agents is useful, for instance, for crosslinking Bolekine to a water-insoluble support matrix or surface for use in the method for purifying anti-Bolekine antibodies, and vice-versa. Commonly used crosslinking agents include, e.g., 1,1-bis(diazoacetyl)-2-phenylethane, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimide esters, for example, esters with 4-azidosalicylic acid, homobifunctional imidoesters, including disuccinimidyl esters such as 3,3'-dithiobis(succinimidylpropionate), bifunctional maleimides such as bis-N-maleimido-1,8-octane and agents such as methyl-3-(p-azidophenyl)dithio]propionimide.

Other modifications include deamidation of glutamyl and asparagyl residues to the corresponding glutamyl and aspartyl residues, respectively, hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl or threonyl residues, methylation of the α -amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], acetylation of the N-terminal amine, and amidation of any C-terminal carboxyl group.

Another type of covalent modification of the Bolekine polypeptide included within the scope of this invention comprises altering the native glycosylation pattern of the polypeptide. "Altering the native glycosylation pattern" is intended for purposes herein to mean deleting one or more carbohydrate moieties found in native sequence Bolekine (either by removing the underlying glycosylation site or by deleting the glycosylation by chemical and/or enzymatic means), and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the native sequence Bolekine. In addition, the phrase includes qualitative changes in the glycosylation of the native proteins, involving a change in the nature and proportions of the various carbohydrate moieties present.

Addition of glycosylation sites to the Bolekine polypeptide may be accomplished by altering the amino acid sequence. The alteration may be made, for example, by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the native sequence Bolekine (for O-linked glycosylation sites). The Bolekine amino acid sequence may optionally be altered through changes at the DNA level, particularly by mutating the

WO 02/077028

PCT/US01/09552

DNA encoding the Bolekine polypeptide at preselected bases such that codons are generated that will translate into the desired amino acids.

Another means of increasing the number of carbohydrate moieties on the Bolekine polypeptide is by chemical or enzymatic coupling of glycosides to the polypeptide. Such methods are described in the art, e.g., in WO 87/05330 published 11 September 1987, and in Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

Removal of carbohydrate moieties present on the Bolekine polypeptide may be accomplished chemically or enzymatically or by mutational substitution of codons encoding for amino acid residues that serve as targets for glycosylation. Chemical deglycosylation techniques are known in the art and described, for instance, by Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) and by Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). Enzymatic cleavage of carbohydrate moieties on polypeptides can be achieved by the use of a variety of endo- and exo-glycosidases as described by Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Another type of covalent modification of Bolekine comprises linking the Bolekine polypeptide to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol, or polyoxyalkylenes, in the manner set forth in U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337.

The Bolekine of the present invention may also be modified in a way to form a chimeric molecule comprising Bolekine fused to another, heterologous polypeptide or amino acid sequence.

In one embodiment, such a chimeric molecule comprises a fusion of the Bolekine with a tag polypeptide which provides an epitope to which an anti-tag antibody can selectively bind. The epitope tag is generally placed at the amino- or carboxyl- terminus of the Bolekine. The presence of such epitope-tagged forms of the Bolekine can be detected using an antibody against the tag polypeptide. Also, provision of the epitope tag enables the Bolekine to be readily purified by affinity purification using an anti-tag antibody or another type of affinity matrix that binds to the epitope tag. Various tag polypeptides and their respective antibodies are well known in the art. Examples include poly-histidine (poly-his) or poly-histidine-glycine (poly-his-gly) tags; the flu HA tag polypeptide and its antibody 12CA5 [Field et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]; the c-myc tag and the 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 and 9E10 antibodies thereto [Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; and the Herpes Simplex virus glycoprotein D (gD) tag and its antibody [Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]. Other tag polypeptides include the Flag-peptide [Hopp et al., *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; the KT3 epitope peptide [Martin et al., *Science*, 255:192-194 (1992)]; an α -tubulin epitope peptide [Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]; and the T7 gene 10 protein peptide tag [Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

In an alternative embodiment, the chimeric molecule may comprise a fusion of the Bolekine with an immunoglobulin or a particular region of an immunoglobulin. For a bivalent form of the chimeric molecule (also referred to as an "immunoadhesin"), such a fusion could be to the Fc region of an IgG molecule. The Ig fusions preferably include the substitution of a soluble (transmembrane domain deleted or inactivated) form of a Bolekine polypeptide in place of at least one variable region within an Ig molecule. In a particularly preferred embodiment, the immunoglobulin fusion includes the hinge, CH2 and CH3, or the hinge, CH1, CH2 and CH3

WO 02/077028

PCT/US01/09552

regions of an IgG1 molecule. For the production of immunoglobulin fusions see also US Patent No. 5,428,130 issued June 27, 1995.

D. Preparation of Bolekine

5 The description below relates primarily to production of Bolekine by culturing cells transformed or transfected with a vector containing Bolekine nucleic acid. It is, of course, contemplated that alternative methods, which are well known in the art, may be employed to prepare Bolekine. For instance, the Bolekine sequence, or portions thereof, may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques [see, e.g., Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. *In vitro* protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be accomplished, for instance, using an Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) using manufacturer's instructions. Various portions of the Bolekine may be chemically synthesized separately and combined using chemical or enzymatic methods to produce the full-length Bolekine.

15 1. Isolation of DNA Encoding Bolekine

DNA encoding Bolekine may be obtained from a cDNA library prepared from tissue believed to possess the Bolekine mRNA and to express it at a detectable level. Accordingly, human Bolekine DNA can be conveniently obtained from a cDNA library prepared from human tissue, such as described in the Examples. The Bolekine-encoding gene may also be obtained from a genomic library or by known synthetic procedures (e.g., automated nucleic acid synthesis).

20 Libraries can be screened with probes (such as antibodies to the Bolekine or oligonucleotides of at least about 20-80 bases) designed to identify the gene of interest or the protein encoded by it. Screening the cDNA or genomic library with the selected probe may be conducted using standard procedures, such as described in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 25 1989). An alternative means to isolate the gene encoding Bolekine is to use PCR methodology [Sambrook et al., supra; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

The Examples below describe techniques for screening a cDNA library. The oligonucleotide sequences selected as probes should be of sufficient length and sufficiently unambiguous that false positives are minimized. 30 The oligonucleotide is preferably labeled such that it can be detected upon hybridization to DNA in the library being screened. Methods of labeling are well known in the art, and include the use of radiolabels like ³²P-labeled ATP, biotinylation or enzyme labeling. Hybridization conditions, including moderate stringency and high stringency, are provided in Sambrook et al., supra.

35 Sequences identified in such library screening methods can be compared and aligned to other known sequences deposited and available in public databases such as GenBank or other private sequence databases. Sequence identity (at either the amino acid or nucleotide level) within defined regions of the molecule or across the full-length sequence can be determined using methods known in the art and as described herein.

WO 02/077028

PCT/US01/09552

example, strain W3110 may be modified to effect a genetic mutation in the genes encoding proteins endogenous to the host, with examples of such hosts including *E. coli* W3110 strain 1A2, which has the complete genotype *tonA*; *E. coli* W3110 strain 9E4, which has the complete genotype *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 strain 27C7 (ATCC 55,244), which has the complete genotype *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan'*; *E. coli* W3110 strain 37D6, which has the complete genotype *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7*
 5 *ilvG kan'*; *E. coli* W3110 strain 40B4, which is strain 37D6 with a non-kanamycin resistant *degP* deletion mutation; and an *E. coli* strain having mutant periplasmic protease disclosed in U.S. Patent No. 4,946,783 issued 7 August 1990. Alternatively, *in vitro* methods of cloning, e.g., PCR or other nucleic acid polymerase reactions, are suitable.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning
 10 or expression hosts for Bolekine-encoding vectors. *Saccharomyces cerevisiae* is a commonly used lower eukaryotic host microorganism. Others include *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139,383 published 2 May 1985); *Kluyveromyces* hosts (U.S. Patent No. 4,943,529; Fleeer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) such as, e.g., *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., J. Bacteriol., 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii*
 15 (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilaram* (ATCC 36,906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, and *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* such as *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 published 31 October 1990); and filamentous fungi such as,
 20 e.g., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 published 10 January 1991), and *Aspergillus* hosts such as *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn et al., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) and *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Methylotrophic yeasts are suitable herein and include, but are not limited to, yeast capable of growth on methanol selected from the genera consisting of *Hansenula*, *Candida*,
 25 *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, and *Rhodotorula*. A list of specific species that are exemplary of this class of yeasts may be found in C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

Suitable host cells for the expression of glycosylated Bolekine are derived from multicellular organisms. Examples of invertebrate cells include insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9, as well as plant cells. Examples of useful mammalian host cell lines include Chinese hamster ovary (CHO) and COS cells.
 30 More specific examples include monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59 (1977)); Chinese hamster ovary cells/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); mouse sertoli cells (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); and mouse mammary tumor (MMT
 35 060562, ATCC CCL51). The selection of the appropriate host cell is deemed to be within the skill in the art.

WO 02/077028

PCT/US01/09552

3. Selection and Use of a Replicable Vector

The nucleic acid (e.g., cDNA or genomic DNA) encoding Bolekine may be inserted into a replicable vector for cloning (amplification of the DNA) or for expression. Various vectors are publicly available. The vector may, for example, be in the form of a plasmid, cosmid, viral particle, or phage. The appropriate nucleic acid sequence may be inserted into the vector by a variety of procedures. In general, DNA is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) using techniques known in the art. Vector components generally include, but are not limited to, one or more of a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence. Construction of suitable vectors containing one or more of these components employs standard ligation techniques which are known to the skilled artisan.

The Bolekine may be produced recombinantly not only directly, but also as a fusion polypeptide with a heterologous polypeptide, which may be a signal sequence or other polypeptide having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide. In general, the signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of the Bolekine-encoding DNA that is inserted into the vector. The signal sequence may be a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, lpp, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion the signal sequence may be, e.g., the yeast invertase leader, alpha factor leader (including *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* α -factor leaders, the latter described in U.S. Patent No. 5,010,182), or acid phosphatase leader, the *C. albicans* glucoamylase leader (EP 362,179 published 4 April 1990), or the signal described in WO 90/13646 published 15 November 1990. In mammalian cell expression, mammalian signal sequences may be used to direct secretion of the protein, such as signal sequences from secreted polypeptides of the same or related species, as well as viral secretory leaders.

Both expression and cloning vectors contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. Such sequences are well known for a variety of bacteria, yeast, and viruses. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria, the 2μ plasmid origin is suitable for yeast, and various viral origins (SV40, polyoma, adenovirus, VSV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells.

Expression and cloning vectors will typically contain a selection gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients not available from complex media, e.g., the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*.

An example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the Bolekine-encoding nucleic acid, such as DHFR or thymidine kinase. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the CHO cell line deficient in DHFR activity, prepared and propagated as described by Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). A suitable selection gene for use in yeast is the *trp1* gene present in the yeast plasmid YRp7 [Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)]. The *trp1* gene provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example,

WO 02/077028

PCT/US01/09552

ATCC No. 44076 or PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

Expression and cloning vectors usually contain a promoter operably linked to the Bolekine-encoding nucleic acid sequence to direct mRNA synthesis. Promoters recognized by a variety of potential host cells are well known. Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the β -lactamase and lactose promoter systems [Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)], alkaline phosphatase, 5 a tryptophan (trp) promoter system [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36,776], and hybrid promoters such as the tac promoter [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Promoters for use in bacterial systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding Bolekine.

10 Examples of suitable promoting sequences for use with yeast hosts include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase [Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] or other glycolytic enzymes [Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, gluco-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase.

15 Other yeast promoters, which are inducible promoters having the additional advantage of transcription controlled by growth conditions, are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, metallothionein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in EP 73,657.

20 Bolekine transcription from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus (UK 2,211,504 published 5 July 1989), adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40), from heterologous mammalian promoters, e.g., the actin promoter or an immunoglobulin promoter, and from heat-shock promoters, provided such promoters are 25 compatible with the host cell systems.

Transcription of a DNA encoding the Bolekine by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp, that act on a promoter to increase its transcription. Many enhancer sequences are now known from 30 mammalian genes (globin, elastase, albumin, α -fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the Bolekine coding sequence, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

35 Expression vectors used in eukaryotic host cells (yeast, fungi, insect, plant, animal, human, or nucleated cells from other multicellular organisms) will also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and, occasionally 3', untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide

WO 02/077028

PCT/US01/09552

E. Uses for Bolekine

Nucleotide sequences (or their complement) encoding Bolekine have various applications in the art of molecular biology, including uses as hybridization probes, in chromosome and gene mapping and in the generation of anti-sense RNA and DNA. Bolekine nucleic acid will also be useful for the preparation of Bolekine polypeptides by the recombinant techniques described herein.

5 The full-length native sequence Bolekine gene, or portions thereof, may be used as hybridization probes for a cDNA library to isolate the full-length Bolekine cDNA or to isolate still other cDNAs (for instance, those encoding naturally-occurring variants of Bolekine or Bolekine from other species) which have a desired sequence identity to the native Bolekine sequence disclosed herein. Optionally, the length of the probes will be about 20 to about 50 bases. The hybridization probes may be derived from at least partially novel regions of the full
10 length native nucleotide sequence wherein those regions may be determined without undue experimentation or from genomic sequences including promoters, enhancer elements and introns of native sequence Bolekine. By way of example, a screening method will comprise isolating the coding region of the Bolekine gene using the known DNA sequence to synthesize a selected probe of about 40 bases. Hybridization probes may be labeled by a variety of labels, including radionucleotides such as ³²P or ³⁵S, or enzymatic labels such as alkaline
15 phosphatase coupled to the probe via avidin/biotin coupling systems. Labeled probes having a sequence complementary to that of the Bolekine gene of the present invention can be used to screen libraries of human cDNA, genomic DNA or mRNA to determine which members of such libraries the probe hybridizes to. Hybridization techniques are described in further detail in the Examples below.

Any EST sequences disclosed in the present application may similarly be employed as probes, using
20 the methods disclosed herein.

Other useful fragments of the Bolekine nucleic acids include antisense or sense oligonucleotides comprising a single-stranded nucleic acid sequence (either RNA or DNA) capable of binding to target Bolekine mRNA (sense) or Bolekine DNA (antisense) sequences. Antisense or sense oligonucleotides, according to the present invention, comprise a fragment of the coding region of Bolekine DNA. Such a fragment generally
25 comprises at least about 14 nucleotides, preferably from about 14 to 30 nucleotides. The ability to derive an antisense or a sense oligonucleotide, based upon a cDNA sequence encoding a given protein is described in, for example, Stein and Cohen (*Cancer Res.* 48:2659, 1988) and van der Krol et al. (*BioTechniques* 6:958, 1988).

Binding of antisense or sense oligonucleotides to target nucleic acid sequences results in the formation of duplexes that block transcription or translation of the target sequence by one of several means, including
30 enhanced degradation of the duplexes, premature termination of transcription or translation, or by other means. The antisense oligonucleotides thus may be used to block expression of Bolekine proteins. Antisense or sense oligonucleotides further comprise oligonucleotides having modified sugar-phosphodiester backbones (or other sugar linkages, such as those described in WO 91/06629) and wherein such sugar linkages are resistant to endogenous nucleases. Such oligonucleotides with resistant sugar linkages are stable *in vivo* (i.e., capable of
35 resisting enzymatic degradation) but retain sequence specificity to be able to bind to target nucleotide sequences.

Other examples of sense or antisense oligonucleotides include those oligonucleotides which are covalently linked to organic moieties, such as those described in WO 90/10048, and other moieties that increases

WO 02/077028

PCT/US01/09552

affinity of the oligonucleotide for a target nucleic acid sequence, such as poly-(L-lysine). Further still, intercalating agents, such as ellipticine, and alkylating agents or metal complexes may be attached to sense or antisense oligonucleotides to modify binding specificities of the antisense or sense oligonucleotide for the target nucleotide sequence.

5 Antisense or sense oligonucleotides may be introduced into a cell containing the target nucleic acid sequence by any gene transfer method, including, for example, CaPO₄-mediated DNA transfection, electroporation, or by using gene transfer vectors such as Epstein-Barr virus. In a preferred procedure, an antisense or sense oligonucleotide is inserted into a suitable retroviral vector. A cell containing the target nucleic acid sequence is contacted with the recombinant retroviral vector, either *in vivo* or *ex vivo*. Suitable retroviral vectors include, but are not limited to, those derived from the murine retrovirus M-MuLV, N2 (a retrovirus derived from M-MuLV), or the double copy vectors designated DCT5A, DCT5B and DCT5C (see WO 10 90/13641).

15 Sense or antisense oligonucleotides also may be introduced into a cell containing the target nucleotide sequence by formation of a conjugate with a ligand binding molecule, as described in WO 91/04753. Suitable ligand binding molecules include, but are not limited to, cell surface receptors, growth factors, other cytokines, or other ligands that bind to cell surface receptors. Preferably, conjugation of the ligand binding molecule does not substantially interfere with the ability of the ligand binding molecule to bind to its corresponding molecule or receptor, or block entry of the sense or antisense oligonucleotide or its conjugated version into the cell.

20 Alternatively, a sense or an antisense oligonucleotide may be introduced into a cell containing the target nucleic acid sequence by formation of an oligonucleotide-lipid complex, as described in WO 90/10448. The sense or antisense oligonucleotide-lipid complex is preferably dissociated within the cell by an endogenous lipase.

25 Antisense or sense RNA or DNA molecules are generally at least about 5 bases in length, about 10 bases in length, about 15 bases in length, about 20 bases in length, about 25 bases in length, about 30 bases in length, about 35 bases in length, about 40 bases in length, about 45 bases in length, about 50 bases in length, about 55 bases in length, about 60 bases in length, about 65 bases in length, about 70 bases in length, about 75 bases in length, about 80 bases in length, about 85 bases in length, about 90 bases in length, about 95 bases in length, about 100 bases in length, or more.

The probes may also be employed in PCR techniques to generate a pool of sequences for identification of closely related Bolekine coding sequences.

30 Nucleotide sequences encoding Bolekine can also be used to construct hybridization probes for mapping the gene which encodes that Bolekine and for the genetic analysis of individuals with genetic disorders. The nucleotide sequences provided herein may be mapped to a chromosome and specific regions of a chromosome using known techniques, such as *in situ* hybridization, linkage analysis against known chromosomal markers, and hybridization screening with libraries.

35 When the coding sequences for Bolekine encode a protein which binds to another protein (example, where the Bolekine is a receptor), the Bolekine can be used in assays to identify the other proteins or molecules involved in the binding interaction. By such methods, inhibitors of the receptor/ligand binding interaction can be identified. Proteins involved in such binding interactions can also be used to screen for peptide or small

WO 02/077028

PCT/US01/09552

molecule inhibitors or agonists of the binding interaction. Also, the receptor Bolekine can be used to isolate correlative ligand(s). Screening assays can be designed to find lead compounds that mimic the biological activity of a native Bolekine or a receptor for Bolekine. Such screening assays will include assays amenable to high-throughput screening of chemical libraries, making them particularly suitable for identifying small molecule drug candidates. Small molecules contemplated include synthetic organic or inorganic compounds. The assays can be performed in a variety of formats, including protein-protein binding assays, biochemical screening assays, immunoassays and cell based assays, which are well characterized in the art.

5
10
15
20

Nucleic acids which encode Bolekine or its modified forms can also be used to generate either transgenic animals or "knock out" animals which, in turn, are useful in the development and screening of therapeutically useful reagents. A transgenic animal (e.g., a mouse or rat) is an animal having cells that contain a transgene, which transgene was introduced into the animal or an ancestor of the animal at a prenatal, e.g., an embryonic stage. A transgene is a DNA which is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops. In one embodiment, cDNA encoding Bolekine can be used to clone genomic DNA encoding Bolekine in accordance with established techniques and the genomic sequences used to generate transgenic animals that contain cells which express DNA encoding Bolekine. Methods for generating transgenic animals, particularly animals such as mice or rats, have become conventional in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,736,866 and 4,870,009. Typically, particular cells would be targeted for Bolekine transgene incorporation with tissue-specific enhancers. Transgenic animals that include a copy of a transgene encoding Bolekine introduced into the germ line of the animal at an embryonic stage can be used to examine the effect of increased expression of DNA encoding Bolekine. Such animals can be used as tester animals for reagents thought to confer protection from, for example, pathological conditions associated with its overexpression. In accordance with this facet of the invention, an animal is treated with the reagent and a reduced incidence of the pathological condition, compared to untreated animals bearing the transgene, would indicate a potential therapeutic intervention for the pathological condition.

25
30
35

Alternatively, non-human homologues of Bolekine can be used to construct a Bolekine "knock out" animal which has a defective or altered gene encoding Bolekine as a result of homologous recombination between the endogenous gene encoding Bolekine and altered genomic DNA encoding Bolekine introduced into an embryonic stem cell of the animal. For example, cDNA encoding Bolekine can be used to clone genomic DNA encoding Bolekine in accordance with established techniques. A portion of the genomic DNA encoding Bolekine can be deleted or replaced with another gene, such as a gene encoding a selectable marker which can be used to monitor integration. Typically, several kilobases of unaltered flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the vector [see e.g., Thomas and Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) for a description of homologous recombination vectors]. The vector is introduced into an embryonic stem cell line (e.g., by electroporation) and cells in which the introduced DNA has homologously recombined with the endogenous DNA are selected [see e.g., Li et al., *Cell*, 69:915 (1992)]. The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (e.g., a mouse or rat) to form aggregation chimeras [see e.g., Bradley, in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal and the embryo brought to term to create

WO 02/077028

PCT/US01/09552

a "knock out" animal. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be identified by standard techniques and used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously recombined DNA. Knockout animals can be characterized for instance, for their ability to defend against certain pathological conditions and for their development of pathological conditions due to absence of the Bolekine polypeptide.

5 Nucleic acid encoding the Bolekine polypeptides may also be used in gene therapy. In gene therapy applications, genes are introduced into cells in order to achieve *in vivo* synthesis of a therapeutically effective genetic product, for example for replacement of a defective gene. "Gene therapy" includes both conventional gene therapy where a lasting effect is achieved by a single treatment, and the administration of gene therapeutic agents, which involves the one time or repeated administration of a therapeutically effective DNA or mRNA.

10 Antisense RNAs and DNAs can be used as therapeutic agents for blocking the expression of certain genes *in vivo*. It has already been shown that short antisense oligonucleotides can be imported into cells where they act as inhibitors, despite their low intracellular concentrations caused by their restricted uptake by the cell membrane. (Zamecnik *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986]). The oligonucleotides can be modified to enhance their uptake, e.g. by substituting their negatively charged phosphodiester groups by uncharged groups.

15

There are a variety of techniques available for introducing nucleic acids into viable cells. The techniques vary depending upon whether the nucleic acid is transferred into cultured cells *in vitro*, or *in vivo* in the cells of the intended host. Techniques suitable for the transfer of nucleic acid into mammalian cells *in vitro* include the use of liposomes, electroporation, microinjection, cell fusion, DEAE dextran, the calcium phosphate precipitation method, etc. The currently preferred *in vivo* gene transfer techniques include transfection with viral (typically retroviral) vectors and viral coat protein-liposome mediated transfection (Dzau *et al.*, Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993]). In some situations it is desirable to provide the nucleic acid source with an agent that targets the target cells, such as an antibody specific for a cell surface membrane protein or the target cell, a ligand for a receptor on the target cell, etc. Where liposomes are employed, proteins which bind to a cell surface membrane protein associated with endocytosis may be used for targeting and/or to facilitate uptake, e.g. capsid proteins or fragments thereof tropic for a particular cell type, antibodies for proteins which undergo internalization in cycling, proteins that target intracellular localization and enhance intracellular half-life. The technique of receptor-mediated endocytosis is described, for example, by Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); and Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990). For review of gene marking and gene therapy protocols see Anderson *et al.*, Science 256, 808-813 (1992).

20

25

30

The Bolekine polypeptides described herein may also be employed as molecular weight markers for protein electrophoresis purposes and the isolated nucleic acid sequences may be used for recombinantly expressing those markers.

The nucleic acid molecules encoding the Bolekine polypeptides or fragments thereof described herein are useful for chromosome identification. In this regard, there exists an ongoing need to identify new chromosome markers, since relatively few chromosome marking reagents, based upon actual sequence data are presently available. Each Bolekine nucleic acid molecule of the present invention can be used as a chromosome

35

WO 02/077028

PCT/US01/09552

marker.

The Bolekine polypeptides and nucleic acid molecules of the present invention may also be used diagnostically for tissue typing, wherein the Bolekine polypeptides of the present invention may be differentially expressed in one tissue as compared to another, preferably in a diseased tissue as compared to a normal tissue of the same tissue type. Bolekine nucleic acid molecules will find use for generating probes for PCR, Northern analysis, Southern analysis and Western analysis.

The Bolekine polypeptides described herein may also be employed as therapeutic agents. The Bolekine polypeptides of the present invention can be formulated according to known methods to prepare pharmaceutically useful compositions, whereby the Bolekine product hereof is combined in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier vehicle. Therapeutic formulations are prepared for storage by mixing the active ingredient having the desired degree of purity with optional physiologically acceptable carriers, excipients or stabilizers (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone, amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEENTM, PLURONICSTM or PEG.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes, prior to or following lyophilization and reconstitution.

Therapeutic compositions herein generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

The route of administration is in accord with known methods, e.g. injection or infusion by intravenous, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial or intralesional routes, topical administration, or by sustained release systems.

Dosages and desired drug concentrations of pharmaceutical compositions of the present invention may vary depending on the particular use envisioned. The determination of the appropriate dosage or route of administration is well within the skill of an ordinary physician. Animal experiments provide reliable guidance for the determination of effective doses for human therapy. Interspecies scaling of effective doses can be performed following the principles laid down by Mordenti, J. and Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96.

When *in vivo* administration of a Bolekine polypeptide or agonist or antagonist thereof is employed, normal dosage amounts may vary from about 10 ng/kg to up to 100 mg/kg of mammal body weight or more per day, preferably about 1 µg/kg/day to 10 mg/kg/day, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature; see, for example, U.S. Pat. Nos.

WO 02/077028

PCT/US01/09552

4,657,760; 5,206,344; or 5,225,212. It is anticipated that different formulations will be effective for different treatment compounds and different disorders, that administration targeting one organ or tissue, for example, may necessitate delivery in a manner different from that to another organ or tissue.

Where sustained-release administration of a Bolekine polypeptide is desired in a formulation with release characteristics suitable for the treatment of any disease or disorder requiring administration of the Bolekine polypeptide, microencapsulation of the Bolekine polypeptide is contemplated. Microencapsulation of recombinant proteins for sustained release has been successfully performed with human growth hormone (rhGH), interferon- (rhIFN-), interleukin-2, and MN rgp120. Johnson et al., *Nat. Med.*, 2:795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27:1221-1223 (1993); Hora et al., *BioTechnology*, 8:753-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; and U.S. Pat. No. 5,654,010.

The sustained-release formulations of these proteins were developed using poly-lactide-coglycolic acid (PLGA) polymer due to its biocompatibility and wide range of biodegradable properties. The degradation products of PLGA, lactic and glycolic acids, can be cleared quickly within the human body. Moreover, the degradability of this polymer can be adjusted from months to years depending on its molecular weight and composition. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," in: M. Chasin and R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41.

This invention encompasses methods of screening compounds to identify those that mimic the Bolekine polypeptide (agonists) or prevent the effect of the Bolekine polypeptide (antagonists). Screening assays for antagonist drug candidates are designed to identify compounds that bind or complex with the Bolekine polypeptides encoded by the genes identified herein, or otherwise interfere with the interaction of the encoded polypeptides with other cellular proteins. Such screening assays will include assays amenable to high-throughput screening of chemical libraries, making them particularly suitable for identifying small molecule drug candidates.

The assays can be performed in a variety of formats, including protein-protein binding assays, biochemical screening assays, immunoassays, and cell-based assays, which are well characterized in the art.

All assays for antagonists are common in that they call for contacting the drug candidate with a Bolekine polypeptide encoded by a nucleic acid identified herein under conditions and for a time sufficient to allow these two components to interact.

In binding assays, the interaction is binding and the complex formed can be isolated or detected in the reaction mixture. In a particular embodiment, the Bolekine polypeptide encoded by the gene identified herein or the drug candidate is immobilized on a solid phase, e.g., on a microtiter plate, by covalent or non-covalent attachments. Non-covalent attachment generally is accomplished by coating the solid surface with a solution of the Bolekine polypeptide and drying. Alternatively, an immobilized antibody, e.g., a monoclonal antibody, specific for the Bolekine polypeptide to be immobilized can be used to anchor it to a solid surface. The assay is performed by adding the non-immobilized component, which may be labeled by a detectable label, to the immobilized component, e.g., the coated surface containing the anchored component. When the reaction is

WO 02/077028

PCT/US01/09552

complete, the non-reacted components are removed, e.g., by washing, and complexes anchored on the solid surface are detected. When the originally non-immobilized component carries a detectable label, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexing occurred. Where the originally non-immobilized component does not carry a label, complexing can be detected, for example, by using a labeled antibody specifically binding the immobilized complex.

5 If the candidate compound interacts with but does not bind to a particular Bolekine polypeptide encoded by a gene identified herein, its interaction with that polypeptide can be assayed by methods well known for detecting protein-protein interactions. Such assays include traditional approaches, such as, e.g., cross-linking, co-immunoprecipitation, and co-purification through gradients or chromatographic columns. In addition, protein-protein interactions can be monitored by using a yeast-based genetic system described by Fields and co-workers (Fields and Song, *Nature (London)*, 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)) as disclosed by Chevray and Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Many transcriptional activators, such as yeast GAL4, consist of two physically discrete modular domains, one acting as the DNA-binding domain, the other one functioning as the transcription-activation domain. The yeast expression system described in the foregoing publications (generally referred to as the "two-hybrid system") takes advantage of this property, and employs two hybrid proteins, one in which the target protein is fused to the DNA-binding domain of GAL4, and another, in which candidate activating proteins are fused to the activation domain. The expression of a GAL1-*lacZ* reporter gene under control of a GAL4-activated promoter depends on reconstitution of GAL4 activity via protein-protein interaction. Colonies containing interacting polypeptides are detected with a chromogenic substrate for β -galactosidase. A complete kit (MATCHMAKERTM) for identifying protein-protein interactions between two specific proteins using the two-hybrid technique is commercially available from Clontech. This system can also be extended to map protein domains involved in specific protein interactions as well as to pinpoint amino acid residues that are crucial for these interactions.

25 Compounds that interfere with the interaction of a gene encoding a Bolekine polypeptide identified herein and other intra- or extracellular components can be tested as follows: usually a reaction mixture is prepared containing the product of the gene and the intra- or extracellular component under conditions and for a time allowing for the interaction and binding of the two products. To test the ability of a candidate compound to inhibit binding, the reaction is run in the absence and in the presence of the test compound. In addition, a placebo may be added to a third reaction mixture, to serve as positive control. The binding (complex formation) between the test compound and the intra- or extracellular component present in the mixture is monitored as described hereinabove. The formation of a complex in the control reaction(s) but not in the reaction mixture containing the test compound indicates that the test compound interferes with the interaction of the test compound and its reaction partner.

35 To assay for antagonists, the Bolekine polypeptide may be added to a cell along with the compound to be screened for a particular activity and the ability of the compound to inhibit the activity of interest in the presence of the Bolekine polypeptide indicates that the compound is an antagonist to the Bolekine polypeptide. Alternatively, antagonists may be detected by combining the Bolekine polypeptide and a potential antagonist with

WO 02/077028

PCT/US01/09552

membrane-bound Bolekine polypeptide receptors or recombinant receptors under appropriate conditions for a competitive inhibition assay. The Bolekine polypeptide can be labeled, such as by radioactivity, such that the number of Bolekine polypeptide molecules bound to the receptor can be used to determine the effectiveness of the potential antagonist. The gene encoding the receptor can be identified by numerous methods known to those of skill in the art, for example, ligand panning and FACS sorting. Coligan et al., Current Protocols in Immun., I(2): Chapter 5 (1991). Preferably, expression cloning is employed wherein polyadenylated RNA is prepared from a cell responsive to the Bolekine polypeptide and a cDNA library created from this RNA is divided into pools and used to transfect COS cells or other cells that are not responsive to the Bolekine polypeptide. Transfected cells that are grown on glass slides are exposed to labeled Bolekine polypeptide. The Bolekine polypeptide can be labeled by a variety of means including iodination or inclusion of a recognition site for a site-specific protein kinase. Following fixation and incubation, the slides are subjected to autoradiographic analysis. Positive pools are identified and sub-pools are prepared and re-transfected using an interactive sub-pooling and re-screening process, eventually yielding a single clone that encodes the putative receptor.

As an alternative approach for receptor identification, labeled Bolekine polypeptide can be photoaffinity-linked with cell membrane or extract preparations that express the receptor molecule. Cross-linked material is resolved by PAGE and exposed to X-ray film. The labeled complex containing the receptor can be excised, resolved into peptide fragments, and subjected to protein micro-sequencing. The amino acid sequence obtained from micro-sequencing would be used to design a set of degenerate oligonucleotide probes to screen a cDNA library to identify the gene encoding the putative receptor.

In another assay for antagonists, mammalian cells or a membrane preparation expressing the receptor would be incubated with labeled Bolekine polypeptide in the presence of the candidate compound. The ability of the compound to enhance or block this interaction could then be measured.

More specific examples of potential antagonists include an oligonucleotide that binds to the fusions of immunoglobulin with Bolekine polypeptide, and, in particular, antibodies including, without limitation, poly- and monoclonal antibodies and antibody fragments, single-chain antibodies, anti-idiotypic antibodies, and chimeric or humanized versions of such antibodies or fragments, as well as human antibodies and antibody fragments. Alternatively, a potential antagonist may be a closely related protein, for example, a mutated form of the Bolekine polypeptide that recognizes the receptor but imparts no effect, thereby competitively inhibiting the action of the Bolekine polypeptide.

Another potential Bolekine polypeptide antagonist is an antisense RNA or DNA construct prepared using antisense technology, where, e.g., an antisense RNA or DNA molecule acts to block directly the translation of mRNA by hybridizing to targeted mRNA and preventing protein translation. Antisense technology can be used to control gene expression through triple-helix formation or antisense DNA or RNA, both of which methods are based on binding of a polynucleotide to DNA or RNA. For example, the 5' coding portion of the polynucleotide sequence, which encodes the mature Bolekine polypeptides herein, is used to design an antisense RNA oligonucleotide of from about 10 to 40 base pairs in length. A DNA oligonucleotide is designed to be complementary to a region of the gene involved in transcription (triple helix - see Lee et al., Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney et al., Science, 241: 456 (1988); Dervan et al., Science, 251:1360 (1991)), thereby

WO 02/077028

PCT/US01/09552

preventing transcription and the production of the Bolekine polypeptide. The antisense RNA oligonucleotide hybridizes to the mRNA *in vivo* and blocks translation of the mRNA molecule into the Bolekine polypeptide (antisense - Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). The oligonucleotides described above can also be delivered to cells such that the antisense RNA or DNA may be expressed *in vivo* to inhibit production of the Bolekine polypeptide. When antisense DNA is used, oligodeoxyribonucleotides derived from the translation-initiation site, e.g., between about -10 and +10 positions of the target gene nucleotide sequence, are preferred.

Potential antagonists include small molecules that bind to the active site, the receptor binding site, or growth factor or other relevant binding site of the Bolekine polypeptide, thereby blocking the normal biological activity of the Bolekine polypeptide. Examples of small molecules include, but are not limited to, small peptides or peptide-like molecules, preferably soluble peptides, and synthetic non-peptidyl organic or inorganic compounds.

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. Ribozymes act by sequence-specific hybridization to the complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Specific ribozyme cleavage sites within a potential RNA target can be identified by known techniques. For further details see, e.g., Rossi, Current Biology, 4:469-471 (1994), and PCT publication No. WO 97/33551 (published September 18, 1997).

Nucleic acid molecules in triple-helix formation used to inhibit transcription should be single-stranded and composed of deoxynucleotides. The base composition of these oligonucleotides is designed such that it promotes triple-helix formation via Hoogsteen base-pairing rules, which generally require sizeable stretches of purines or pyrimidines on one strand of a duplex. For further details see, e.g., PCT publication No. WO 97/33551, *supra*.

These small molecules can be identified by any one or more of the screening assays discussed hereinabove and/or by any other screening techniques well known for those skilled in the art.

Diagnostic and therapeutic uses of the herein disclosed molecules may also be based upon the positive functional assay hits disclosed and described below.

As chemokines that lack the ELR motif such as Bolekine, are angiostatic (Strieter RM. et al. Journal of Biological Chemistry 1995; 270: 27348-27357), then Bolekine may be useful in treating tumors by inhibiting the neovascularization that accompanies tumor growth. Administration of the Bolekine polypeptide either alone or in combination with another angiostatic factor such as anti-VEGF, may prove useful in limiting or reducing tumor growth.

Chemokines may be able to activate immune cells, as shown with the CXC chemokines activation of neutrophils (Baggiolini et al. Adv Immunology 1994; 55:97-179), and the non-CXC chemokines are mainly chemotactic for T lymphocytes. Bolekine may be useful in treating infection, as local administration of the polypeptide would stimulate immune cells already present at the site of infection and induce more immune cells to migrate to the site, thus removing the infection at a faster rate.

WO 02/077028

PCT/US01/09552

F. Anti-Bolekin Antibodies

The present invention further provides anti-Bolekin antibodies. Exemplary antibodies include polyclonal, monoclonal, humanized, bispecific, and heteroconjugate antibodies.

1. Polyclonal Antibodies

5 The anti-Bolekin antibodies may comprise polyclonal antibodies. Methods of preparing polyclonal antibodies are known to the skilled artisan. Polyclonal antibodies can be raised in a mammal, for example, by one or more injections of an immunizing agent and, if desired, an adjuvant. Typically, the immunizing agent and/or adjuvant will be injected in the mammal by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections. The immunizing agent may include the Bolekin polypeptide or a fusion protein thereof. It may be useful to conjugate the immunizing agent to a protein known to be immunogenic in the mammal being immunized.
10 Examples of such immunogenic proteins include but are not limited to keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, and soybean trypsin inhibitor. Examples of adjuvants which may be employed include Freund's complete adjuvant and MPL-TDM adjuvant (monophosphoryl Lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate). The immunization protocol may be selected by one skilled in the art without undue experimentation.

15 2. Monoclonal Antibodies

The anti-Bolekin antibodies may, alternatively, be monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies may be prepared using hybridoma methods, such as those described by Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975). In a hybridoma method, a mouse, hamster, or other appropriate host animal, is typically immunized with an immunizing agent to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically
20 bind to the immunizing agent. Alternatively, the lymphocytes may be immunized *in vitro*.

The immunizing agent will typically include the Bolekin polypeptide or a fusion protein thereof. Generally, either peripheral blood lymphocytes ("PBLs") are used if cells of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used if non-human mammalian sources are desired. The lymphocytes are then fused with an immortalized cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a
25 hybridoma cell [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Immortalized cell lines are usually transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine and human origin. Usually, rat or mouse myeloma cell lines are employed. The hybridoma cells may be cultured in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, immortalized cells. For example, if the parental cells lack the enzyme hypoxanthine
30 guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine ("HAT medium"), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred immortalized cell lines are those that fuse efficiently, support stable high level expression of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. More preferred immortalized cell lines are murine myeloma lines, which can be obtained, for instance, from the Salk
35 Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the

WO 02/077028

PCT/US01/09552

production of human monoclonal antibodies [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63].

The culture medium in which the hybridoma cells are cultured can then be assayed for the presence of monoclonal antibodies directed against Bolekine. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Such techniques and assays are known in the art. The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

After the desired hybridoma cells are identified, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods [Goding, supra]. Suitable culture media for this purpose include, for example, Dulbecco's Modified Eagle's Medium and RPMI-1640 medium. Alternatively, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites in a mammal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones may be isolated or purified from the culture medium or ascites fluid by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

The monoclonal antibodies may also be made by recombinant DNA methods, such as those described in U.S. Patent No. 4,816,567. DNA encoding the monoclonal antibodies of the invention can be readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells of the invention serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences [U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison et al., supra] or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. Such a non-immunoglobulin polypeptide can be substituted for the constant domains of an antibody of the invention, or can be substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent antibody.

The antibodies may be monovalent antibodies. Methods for preparing monovalent antibodies are well known in the art. For example, one method involves recombinant expression of immunoglobulin light chain and modified heavy chain. The heavy chain is truncated generally at any point in the Fc region so as to prevent heavy chain crosslinking. Alternatively, the relevant cysteine residues are substituted with another amino acid residue or are deleted so as to prevent crosslinking.

In vitro methods are also suitable for preparing monovalent antibodies. Digestion of antibodies to produce fragments thereof, particularly, Fab fragments, can be accomplished using routine techniques known in the art.

WO 02/077028

PCT/US01/09552

3. Human and Humanized Antibodies

The anti-Boleikine antibodies of the invention may further comprise humanized antibodies or human antibodies. Humanized forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab)'), or other antigen-binding subsequences of antibodies) which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin.

5 Humanized antibodies include human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementary determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, Fv framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Humanized antibodies may also comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin [Jones et al., *Nature*, **321**:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, **332**:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, **2**:593-596 (1992)].

10 Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers [Jones et al., *Nature*, **321**:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, **332**:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, **239**:1534-1536 (1988)], by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567), wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

20 Human antibodies can also be produced using various techniques known in the art, including phage display libraries [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, **227**:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, **222**:581 (1991)]. The techniques of Cole et al. and Boerner et al. are also available for the preparation of human monoclonal antibodies (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) and Boerner et al., *J. Immunol.*, **147**(1):86-95 (1991)]. Similarly, human antibodies can be made by introducing of human immunoglobulin loci into transgenic animals, e.g., mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. Upon challenge, human antibody production is observed, which closely resembles that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and antibody repertoire. This approach is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, and in the following scientific publications: Marks et al.,

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

The antibodies may also be affinity matured using known selection and/or mutagenesis methods as described above. Preferred affinity matured antibodies have an affinity which is five times, more preferably 10 times, even more preferably 20 or 30 times greater than the starting antibody (generally murine, humanized or human) from which the matured antibody is prepared.

4. Bispecific Antibodies

Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present case, one of the binding specificities is for the Bolekine, the other one is for any other antigen, and preferably for a cell-surface protein or receptor or receptor subunit.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chains have different specificities [Milstein and Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)]. Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule is usually accomplished by affinity chromatography steps. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829, published 13 May 1993, and in Trautnecker *et al.*, EMBO J., 10:3653-3659 (1991).

Antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) can be fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy-chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light-chain binding present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy-chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

According to another approach described in WO 96/27011, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the CH3 region of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (e.g. tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g. alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments (e.g. F(ab)'), bispecific antibodies). Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have been

WO 02/077028

PCT/US01/09552

described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate F(ab')₂ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

Fab' fragments may be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody F(ab')₂ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain variable domain (V_L) by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V_H and V_L domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See, Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Exemplary bispecific antibodies may bind to two different epitopes on a given Bolekine polypeptide herein. Alternatively, an anti-Bolekine polypeptide arm may be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (e.g. CD2, CD3, CD28, or B7), or Fc receptors for IgG (FcγR), such as FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the cell expressing the particular Bolekine polypeptide. Bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to cells which express a particular Bolekine polypeptide. These antibodies possess a Bolekine-binding arm and an arm which binds a cytotoxic agent or a radionuclide chelator, such as EOTUBE, DPTA, DOTA, or TETA. Another bispecific antibody of interest binds the Bolekine polypeptide and further binds tissue factor (TF).

WO 02/077028

PCT/US01/09552

5. Heteroconjugate Antibodies

Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells [U.S. Patent No. 4,676,980], and for treatment of HIV infection [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. It is contemplated that the antibodies may be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate and those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 4,676,980.

6. Effector Function Engineering

It may be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, so as to enhance, *e.g.*, the effectiveness of the antibody in treating cancer. For example, cysteine residue(s) may be introduced into the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated may have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See Caron *et al.*, J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) and Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity may also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff *et al.* Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered that has dual Fc regions and may thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. See Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989).

7. Immunoconjugates

The invention also pertains to immunoconjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, toxin (*e.g.*, an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (*i.e.*, a radioconjugate).

Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates have been described above.

Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolaca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, saponaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, and ¹⁸⁶Re.

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta *et al.*, Science, 228: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-

WO 02/077028

PCT/US01/09552

isothiocyanatobenzyl-3-methyl-diethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026.

In another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such streptavidin) for utilization in tumor pretargeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (e.g., avidin) that is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a radionucleotide).

8. Immunoliposomes

The antibodies disclosed herein may also be formulated as immunoliposomes. Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556.

Particularly useful liposomes can be generated by the reverse-phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol, and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of the antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in Martin *et al.*, J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) via a disulfide-interchange reaction. A chemotherapeutic agent (such as Doxorubicin) is optionally contained within the liposome. See Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

9. Pharmaceutical Compositions of Antibodies

Antibodies specifically binding a Bolekine polypeptide identified herein, as well as other molecules identified by the screening assays disclosed hereinbefore, can be administered for the treatment of various disorders in the form of pharmaceutical compositions.

If the Bolekine polypeptide is intracellular and whole antibodies are used as inhibitors, internalizing antibodies are preferred. However, lipofections or liposomes can also be used to deliver the antibody, or an antibody fragment, into cells. Where antibody fragments are used, the smallest inhibitory fragment that specifically binds to the binding domain of the target protein is preferred. For example, based upon the variable-region sequences of an antibody, peptide molecules can be designed that retain the ability to bind the target protein sequence. Such peptides can be synthesized chemically and/or produced by recombinant DNA technology. See, e.g., Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993). The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Alternatively, or in addition, the composition may comprise an agent that enhances its function, such as, for example, a cytotoxic agent, cytokine, chemotherapeutic agent, or growth-inhibitory agent. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example,

WO 02/077028

PCT/US01/09552

liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles, and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

5 Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, *e.g.*, films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and γ ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUBolekineN DEPOT™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. When encapsulated antibodies remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37°C, resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies can be devised for stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying sulfhydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

20 G. Uses for anti-Bolekine Antibodies

The anti-Bolekine antibodies of the invention have various utilities. For example, anti-Bolekine antibodies may be used in diagnostic assays for Bolekine, *e.g.*, detecting its expression (and in some cases, differential expression) in specific cells, tissues, or serum. Various diagnostic assay techniques known in the art may be used, such as competitive binding assays, direct or indirect sandwich assays and immunoprecipitation assays conducted in either heterogeneous or homogeneous phases [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158]. The antibodies used in the diagnostic assays can be labeled with a detectable moiety. The detectable moiety should be capable of producing, either directly or indirectly, a detectable signal. For example, the detectable moiety may be a radioisotope, such as ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , or ^{125}I , a fluorescent or chemiluminescent compound, such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, or luciferin, or an enzyme, such as alkaline phosphatase, beta-galactosidase or horseradish peroxidase. Any method known in the art for conjugating the antibody to the detectable moiety may be employed, including those methods described by Hunter et al., Nature, **144**:945 (1962); David et al., Biochemistry, **13**:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., **40**:219 (1981); and Nygren, J. Histochem. and Cytochem., **30**:407 (1982).

35 Anti-Bolekine antibodies also are useful for the affinity purification of Bolekine from recombinant cell culture or natural sources. In this process, the antibodies against Bolekine are immobilized on a suitable support, such as Sephadex resin or filter paper, using methods well known in the art. The immobilized antibody then is contacted with a sample containing the Bolekine to be purified, and thereafter the support is washed with a

WO 02/077028

PCT/US01/09552

suitable solvent that will remove substantially all the material in the sample except the Bolekine, which is bound to the immobilized antibody. Finally, the support is washed with another suitable solvent that will release the Bolekine from the antibody.

The following examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

5 All patent and literature references cited in the present specification are hereby incorporated by reference in their entirety.

EXAMPLES

10 Commercially available reagents referred to in the examples were used according to manufacturer's instructions unless otherwise indicated. The source of those cells identified in the following examples, and throughout the specification, by ATCC accession numbers is the American Type Culture Collection, Manassas, VA.

EXAMPLE 1: Isolation of cDNA Clones Encoding Human Bolekine

15 The extracellular domain (ECD) sequences (including the secretion signal, if any) of from about 950 known secreted proteins from the Swiss-Prot public protein database were used to search expressed sequence tag (EST) databases. The EST databases included public EST databases (e.g., GenBank) and a proprietary EST DNA database (LIFESEQ™, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). The search was performed using the computer program BLAST or BLAST2 (Altschul et al., *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)) as a
20 comparison of the ECD protein sequences to a 6 frame translation of the EST sequence. Those comparisons resulting in a BLAST score of 70 (or in some cases 90) or greater that did not encode known proteins were clustered and assembled into consensus DNA sequences with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington; [http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.html](http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html)).

A consensus DNA sequence was assembled relative to other EST sequences using phrap. Based on the
25 consensus sequence, oligonucleotides were synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for Bolekine. Forward and reverse PCR primers generally range from 20 to 30 nucleotides and are often designed to give a PCR product of about 100-1000 bp in length. The probe sequences are typically 40-55 bp in length. In some cases, additional oligonucleotides are synthesized when the consensus sequence is greater than about
30 1-1.5kbp. In order to screen several libraries for a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification, as per Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, with the PCR primer pair. A positive library was then used to isolate clones encoding the gene of interest by the *in vivo* cloning procedure using the probe oligonucleotide and one of the primer pairs.

A pair of PCR primers (forward and reverse) were synthesized:

35 forward PCR primer: 5'-CAGCGCCCTCCCAATGTCCTG-3' (SEQ ID NO: 3)

reverse PCR primer: 5'-TCCCAACTGGTTTGGAGTTTCCC-3' (SEQ ID NO: 4)

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Additionally, a synthetic oligonucleotide hybridization probe was constructed from the consensus sequence which had the following nucleotide sequence.

hybridization probe

5'-CTCCGGTCAGCATGAGGCTCCTGGCGGCCGCTGCTCCTGCTGCTG-3' (SEQ ID NO:5)

5 In order to screen several libraries for a source of a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification with the PCR primer pair identified above. A positive library was then used to isolate clones encoding the Bolekine gene using the probe oligonucleotide and one of the PCR primers.

10 RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from human fetal kidney tissue. The cDNA libraries used to isolate the cDNA clones were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to SalI hemikinased adaptors, cleaved with NotI, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRKB or pRKD; pRKS5B is a precursor of pRK5D that does not contain the SfiI site; see, Holmes et al., *Science*, 253:1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NotI sites.

15 DNA sequencing of the clones isolated as described above gave the full-length DNA sequence for Bolekine (SEQ ID NO:1) and the derived protein sequence for Bolekine.

The entire nucleotide sequence of Bolekine is shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1). The Bolekine sequence contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 167-169 [Kozak et al., *supra*] and ending at the stop codon at nucleotide positions 500-502 (Figure 1). The 20 predicted polypeptide precursor is 111 amino acids long (Figure 2 (SEQ ID NO:2)). Bolekine has been deposited with the ATCC. It is understood that the deposited clone contains the actual sequence and that the sequences provided herein are merely representative based on current sequencing techniques. Moreover, given the sequences provided herein and knowledge of the universal genetic code, the corresponding nucleotides for any given amino acid can be routinely identified and vice versa.

25 Analysis of the amino acid sequence of the full-length Bolekine polypeptide suggests that portions of it possess sequence identity with human macrophage inflammatory protein-2, cytokine-induced neutrophil chemoattractant 2, and neutrophil chemotactic factor 2-beta, thereby indicating that Bolekine is a novel chemokine.

30 As discussed further below, the cDNA was subcloned into a baculovirus vector and expressed in insect cells as a C-terminally tagged IgG fusion protein. N-terminal sequencing of the resultant protein identified the signal sequence cleavage site, yielding a mature polypeptide of 77 amino acids. The mature sequence, showing 31-40% identity to other human CXC chemokines, includes the four canonical cysteine residues but lacks the ELR motif.

35 EXAMPLE 2: Use of Bolekine-encoding DNA as a hybridization probe

The following method describes use of a nucleotide sequence encoding Bolekine as a hybridization probe.

WO 02/077028

PCT/US01/09552

DNA comprising the coding sequence of full-length Bolekine (as shown in Figure 1, SEQ ID NO:1) is employed as a probe to screen for homologous DNAs (such as those encoding naturally-occurring variants of Bolekine) in human tissue cDNA libraries or human tissue genomic libraries.

Hybridization and washing of filters containing either library DNAs is performed under the following high stringency conditions. Hybridization of radiolabeled Bolekine-derived probe to the filters is performed in a solution of 50% formamide, 5x SSC, 0.1% SDS, 0.1% sodium pyrophosphate, 50 mM sodium phosphate, pH 6.8, 2x Denhardt's solution, and 10% dextran sulfate at 42°C for 20 hours. Washing of the filters is performed in an aqueous solution of 0.1 x SSC and 0.1% SDS at 42°C.

DNAs having a desired sequence identity with the DNA encoding full-length native sequence Bolekine polypeptide can then be identified using standard techniques known in the art.

EXAMPLE 3: Expression of Bolekine Polypeptides in *E. coli*

This example illustrates the preparation of unglycosylated forms of Bolekine polypeptides by recombinant expression in *E. coli*.

The DNA sequence encoding Bolekine (SEQ ID NO:1) is initially amplified using selected PCR primers. The primers should contain restriction enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector. A variety of expression vectors may be employed. An example of a suitable vector is pBR322 (derived from *E. coli*; see Bolivar et al., *Gene*, 2 :95 (1977)) which contains genes for ampicillin and tetracycline resistance. The vector is digested with restriction enzyme and dephosphorylated. The PCR amplified sequences are then ligated into the vector. The vector will preferably include sequences which encode for an antibiotic resistance gene, a trp promoter, a polyhis leader (including the first six STII codons, polyhis sequence, and enterokinase cleavage site), the Bolekine coding region, lambda transcriptional terminator, and an argU gene.

The ligation mixture is then used to transform a selected *E. coli* strain using the methods described in Sambrook et al., *supra*. Transformants are identified by their ability to grow on LB plates and antibiotic resistant colonies are then selected. Plasmid DNA can be isolated and confirmed by restriction analysis and DNA sequencing.

Selected clones can be grown overnight in liquid culture medium such as LB broth supplemented with antibiotics. The overnight culture may subsequently be used to inoculate a larger scale culture. The cells are then grown to a desired optical density, during which the expression promoter is turned on.

After culturing the cells for several more hours, the cells can be harvested by centrifugation. The cell pellet obtained by the centrifugation can be solubilized using various agents known in the art, and the solubilized Bolekine polypeptide can then be purified using a metal chelating column under conditions that allow tight binding of the polypeptide.

EXAMPLE 4: Expression of Bolekine Polypeptides in Mammalian Cells

This example illustrates preparation of glycosylated forms of Bolekine polypeptides by recombinant expression in mammalian cells.

WO 02/077028

PCT/US01/09552

The vector, pRK5 (see EP 307,247, published March 15, 1989), is employed as the expression vector. Optionally, the Bolekine-encoding DNA is ligated into pRK5 with selected restriction enzymes to allow insertion of the Bolekine-encoding DNA using ligation methods such as described in Sambrook et al., supra. The resulting vector is called pRK5-Bolekine.

5 In one embodiment, the selected host cells may be 293 cells. Human 293 cells (ATCC CCL 1573) are grown to confluence in tissue culture plates in medium such as DMEM supplemented with fetal calf serum and optionally, nutrient components and/or antibiotics. About 10 μ g pRK5-Bolekine DNA is mixed with about 1 μ g DNA encoding the VA RNA gene [Thimmappaya et al., Cell, 31 :543 (1982)] and dissolved in 500 μ l of 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.227 M CaCl₂. To this mixture is added, dropwise, 500 μ l of 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM NaPO₄, and a precipitate is allowed to form for 10 minutes at 25°C. The precipitate is suspended and added to the 293 cells and allowed to settle for about four hours at 37°C. The culture medium is aspirated off and 2 ml of 20% glycerol in PBS is added for 30 seconds. The 293 cells are then washed with serum free medium, fresh medium is added and the cells are incubated for about 5 days.

10 Approximately 24 hours after the transfections, the culture medium is removed and replaced with culture medium (alone) or culture medium containing 200 μ Ci/ml ³⁵S-cysteine and 200 μ Ci/ml ³⁵S-methionine. After a 12 hour incubation, the conditioned medium is collected, concentrated on a spin filter, and loaded onto a 15% SDS gel. The processed gel may be dried and exposed to film for a selected period of time to reveal the presence of Bolekine polypeptide. The cultures containing transfected cells may undergo further incubation (in serum free medium) and the medium is tested in selected bioassays.

15 In an alternative technique, Bolekine-encoding DNA may be introduced into 293 cells transiently using the dextran sulfate method described by Sompariyac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). 293 cells are grown to maximal density in a spinner flask and 700 μ g pRK5-Bolekine DNA is added. The cells are first concentrated from the spinner flask by centrifugation and washed with PBS. The DNA-dextran precipitate is incubated on the cell pellet for four hours. The cells are treated with 20% glycerol for 90 seconds, washed with tissue culture medium, and re-introduced into the spinner flask containing tissue culture medium, 5 μ g/ml bovine insulin and 0.1 μ g/ml bovine transferrin. After about four days, the conditioned media is centrifuged and filtered to remove cells and debris. The sample containing expressed Bolekine polypeptide can then be concentrated and purified by any selected method, such as dialysis and/or column chromatography.

25 In another embodiment, Bolekine polypeptide can be expressed in CHO cells. The pRK5-Bolekine vector can be transfected into CHO cells using known reagents such as CaPO₄ or DEAE-dextran. As described above, the cell cultures can be incubated, and the medium replaced with culture medium (alone) or medium containing a radiolabel such as ³⁵S-methionine. After determining the presence of Bolekine polypeptide, the culture medium may be replaced with serum free medium. Preferably, the cultures are incubated for about 6 days, and then the conditioned medium is harvested. The medium containing the expressed Bolekine polypeptide can then be concentrated and purified by any selected method.

35 Epitope-tagged Bolekine polypeptide may also be expressed in host CHO cells. The Bolekine-encoding DNA may be subcloned out of the pRK5 vector. The subclone insert can undergo PCR to fuse in frame with a selected epitope tag such as a poly-his tag into a Baculovirus expression vector. The poly-his tagged Bolekine-

WO 02/077028

PCT/US01/09552

encoding DNA insert can then be subcloned into a SV40 driven vector containing a selection marker such as DHFR for selection of stable clones. Finally, the CHO cells can be transfected (as described above) with the SV40 driven vector. Labeling may be performed, as described above, to verify expression. The culture medium containing the expressed poly-His tagged Bolekine polypeptide can then be concentrated and purified by any selected method, such as by Ni²⁺-chelate affinity chromatography.

5

EXAMPLE 5: Expression of a Bolekine Polypeptide in Yeast

The following method describes recombinant expression of Bolekine polypeptides in yeast. First, yeast expression vectors are constructed for intracellular production or secretion of Bolekine polypeptide from the ADH2/GAPDH promoter. DNA encoding the Bolekine polypeptide of interest, a selected signal peptide and the promoter is inserted into suitable restriction enzyme sites in the selected plasmid to direct intracellular expression of the Bolekine polypeptide. For secretion, DNA encoding the Bolekine polypeptide can be cloned into the selected plasmid, together with DNA encoding the ADH2/GAPDH promoter, the yeast alpha-factor secretory signal/leader sequence, and linker sequences (if needed) for expression of the Bolekine polypeptide.

10

Yeast cells, such as yeast strain AB110, can then be transformed with the expression plasmids described above and cultured in selected fermentation media. The transformed yeast supernatants can be analyzed by precipitation with 10% trichloroacetic acid and separation by SDS-PAGE, followed by staining of the gels with Coomassie Blue stain.

15

Recombinant Bolekine polypeptide can subsequently be isolated and purified by removing the yeast cells from the fermentation medium by centrifugation and then concentrating the medium using selected cartridge filters. The concentrate containing the Bolekine polypeptide may further be purified using selected column chromatography resins.

20

EXAMPLE 6: Preparation of Antibodies that Bind Bolekine Polypeptides

This example illustrates the preparation of monoclonal antibodies which can specifically bind to Bolekine polypeptides.

25

Techniques for producing the monoclonal antibodies are known in the art and are described, for instance, in Goding, *supra*. Immunogens that may be employed include purified Bolekine polypeptide, fusion proteins containing a Bolekine polypeptide, and cells expressing recombinant Bolekine polypeptide on the cell surface. Selection of the immunogen can be made by the skilled artisan without undue experimentation.

30

Mice, such as Balb/c, are immunized with the Bolekine immunogen emulsified in complete Freund's adjuvant and injected subcutaneously or intraperitoneally in an amount from 1-100 micrograms. Alternatively, the immunogen is emulsified in MPL-TDM adjuvant (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) and injected into the animal's hind foot pads. The immunized mice are then boosted 10 to 12 days later with additional immunogen emulsified in the selected adjuvant. Thereafter, for several weeks, the mice may also be boosted with additional immunization injections. Serum samples may be periodically obtained from the mice by retro-orbital bleeding for testing in ELISA assays to detect anti-Bolekine polypeptide antibodies.

35

After a suitable antibody titer has been detected, the animals "positive" for antibodies can be injected

WO 02/077028

PCT/US01/09552

with a final intravenous injection of Bolekine polypeptide. Three to four days later, the mice are sacrificed and the spleen cells are harvested. The spleen cells are then fused (using 35% polyethylene glycol) to a selected murine myeloma cell line such as F3X63AgU.1, available from ATCC, No. CRL 1597. The fusions generate hybridoma cells which can then be plated in 96 well tissue culture plates containing HAT (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine) medium to inhibit proliferation of non-fused cells, myeloma hybrids, and spleen cell hybrids.

The hybridoma cells will be screened in an ELISA for reactivity against Bolekine polypeptide. Determination of "positive" hybridoma cells secreting the desired monoclonal antibodies against a Bolekine polypeptide is within the skill in the art.

The positive hybridoma cells can be injected intraperitoneally into syngeneic Balb/c mice to produce ascites containing the anti-Bolekine polypeptide monoclonal antibodies. Alternatively, the hybridoma cells can be grown in tissue culture flasks or roller bottles. Purification of the monoclonal antibodies produced in the ascites can be accomplished using ammonium sulfate precipitation, followed by gel exclusion chromatography. Alternatively, affinity chromatography based upon binding of antibody to protein A or protein G can be employed.

EXAMPLE 7: Expression of Bolekine Polypeptides in Baculovirus Infected Cells

The following method describes recombinant expression of Bolekine polypeptides in baculovirus infected insect cells.

In general, the Bolekine-encoding DNA is fused upstream of an epitope tag contained within a baculovirus expression vector. Such epitope tags include poly-his tags and immunoglobulin tags (like Fc regions of IgG). A variety of plasmids may be employed, including plasmids derived from commercially available plasmids such as pVL1393 (Novagen). Briefly, the Bolekine-encoding DNA or the desired portion of the Bolekine-encoding DNA (such as the sequence encoding the extracellular domain of a transmembrane protein) is amplified by PCR with primers complementary to the 5' and 3' regions. The 5' primer may incorporate flanking (selected) restriction enzyme sites. The product is then digested with those selected restriction enzymes and subcloned into the expression vector.

The fragment was then subcloned into the pb.PH.IgG vector via those respective sites. The pb.PH.IgG plasmid is a derivatives of the pVL1393 plasmid (Pharmlingen) and encodes the Fc region of the human IgG gene downstream of the cloning site.

In general, recombinant baculovirus is generated by co-transfecting the above plasmid and BaculoGold™ virus DNA (Pharmlingen) into *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") cells (ATCC CRL 1711) using lipofectin (commercially available from GIBCO-BRL). After 4 to 5 days of incubation at 28°C, the released viruses are harvested and used for further amplifications. Viral infection and protein expression is performed as described by O'Reilley et al., Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford:Oxford University Press (1994).

In this case, The pb.PH.SST DNA.IgG plasmid was co-transfected with Baculogold Baculovirus DNA (Pharmlingen) using Lipofectin (Gibco BRL) into 10⁵ Sf9 cells grown in Hink's TNM-FH medium (JRH

WO 02/077028

PCT/US01/09552

Biosciences) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone). Cells were incubated for 5 days at 28°C. The supernatant was harvested and subsequently used for the 1st viral amplification by infecting Sf9 cells in Hink's TNM-FH medium supplemented with 10% FBS at an approximate multiplicity of infection (MOI) of 10. Cells were incubated for 3 days at 28°C. The supernatant was harvested and the expression of the recombinant Bolekin-IgG was determined by batching binding of 1 mL of supernatant to 30 µL of Protein-A Sepharose CL-4B beads (Pharmacia) followed by subsequent SDS-PAGE analysis comparing to a known concentration of protein standard marker by Coomassie blue staining.

5 The first viral amplification supernatant was used to infect a 500 mL spinner culture of Sf9 cells grown in ESF-921 medium (Expression Systems LLC) at an approximate MOI of 0.1. Cells were incubated for 3 days at 28°C. The supernatant was harvested and filtered. Batching binding and SDS-PAGE analysis were repeated to confirm expression in the spinner culture. The 500 mL of supernatant was subsequently submitted for purification.

10 In general, expressed poly-his tagged Bolekine polypeptide can then be purified, for example, by Ni²⁺-chelate affinity chromatography as follows. Extracts are prepared from recombinant virus-infected Sf9 cells as described by Rupert et al., *Nature*, 362:175-179 (1993). Briefly, Sf9 cells are washed, resuspended in sonication buffer (25 mL Hepes, pH 7.9; 12.5 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA; 10% Glycerol; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl), and sonicated twice for 20 seconds on ice. The sonicates are cleared by centrifugation, and the supernatant is diluted 50-fold in loading buffer (50 mM phosphate, 300 mM NaCl, 10% Glycerol, pH 7.8) and filtered through a 0.45 micron filter. A Ni²⁺-NTA agarose column (commercially available from Qiagen) is prepared with a bed volume of 5 mL, washed with 25 mL of water and equilibrated with 25 mL of loading buffer. The filtered cell extract is loaded onto the column at 0.5 mL per minute. The column is washed to baseline A₂₈₀ with loading buffer, at which point fraction collection is started. Next, the column is washed with a secondary wash buffer (50 mM phosphate; 300 mM NaCl, 10% Glycerol, pH 6.0), which elutes nonspecifically bound protein. After reaching A₂₈₀ baseline again, the column is developed with a 0 to 500 mM Imidazole gradient in the secondary wash buffer. One mL fractions are collected and analyzed by SDS-PAGE and silver staining or western blot with Ni²⁺-NTA-conjugated to alkaline phosphatase (Qiagen). Fractions containing the eluted His₁₀-tagged Bolekine polypeptide are pooled and dialyzed against loading buffer.

25 Alternatively, purification of the IgG tagged (or Fc tagged) Bolekine polypeptide can be performed using known chromatography techniques, including for instance, Protein A or protein G column chromatography.

30 In this case, the conditioned media from the transfected Sf9 cells (500 mL, see above) were harvested by centrifugation to remove the cells and filtered through 0.22 micron filters. Immuno-adhesin (Fc containing) constructs of Bolekine protein were purified from the conditioned media. The conditioned media was pumped onto a 5 ml Protein A column (Pharmacia) which had been equilibrated in 20 mM Na phosphate, pH 6.8, buffer. After loading, the column was washed extensively with equilibration buffer before elution with 100 mM citric acid, pH 3.5. The eluted protein was immediately neutralized by collecting 1 ml fractions into tubes containing 275 µL of 1 M Tris, pH 9, buffer. The highly purified protein was subsequently desalted into a storage buffer containing 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl and 4% mannitol, pH 6.8, with a 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) column and stored at -80° C. The homogeneity of the protein was assessed by SDS polyacrylamide gels and

WO 02/077028

PCT/US01/09552

by N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation.

Purified protein encoded by Bolekine was separated on a tris-HCl gel and electroblotted to a PVDF membrane. The band of interest was excised and then subjected to Edman degradation in order to confirm the protein product.

5 EXAMPLE 8: Northern Blot Analysis

Expression of Bolekine mRNA in human tissues was examined by Northern blot analysis. In general, human RNA blots were hybridized to a ³²P-labelled DNA probe based on the full length Bolekine cDNA; the probe was generated by digesting and purifying the Bolekine cDNA insert. Human fetal RNA blot MTN (Clontech) and human adult RNA blot MTN-II (Clontech) were incubated with the DNA probes. Blots were incubated with the probes in hybridization buffer (5 X SSPE; 2 X Denhardt's solution; 100 mg/mL denatured sheared salmon sperm DNA; 50% formamide; 2% SDS) for 60 hours at 42°C. The blots were washed several times in 2 X SSC; 0.05% SDS for 1 hour at room temperature, followed by a 30 minute wash in 0.1X SSC; 0.1% SDS at 50°C. The blots were developed after overnight exposure by phosphorimager analysis (Fuji).

10 In this case, Northern blots containing human poly (A)+RNA from various tissues (2 µg/lane) were purchased from Clontech. A 469-bp fragment containing the entire coding region of Bolekine was amplified by PCR using the following two primers, forward and reverse, respectively:

Forward Primer: 5' AGCGCACGGCCACAGACAG 3' (SEQ ID NO:6)

and

Reverse Primer: 5' GACCCTGCGCTTCTCGTTCCA 3' (SEQ ID NO:7).

20 A Bolekine-specific [³²P]dCTP-labeled cDNA probe was synthesized by random priming of this 469-bp fragment (High Prime, Boehringer Mannheim) and unincorporated nucleotides were removed (NucTrap Probe Purification Column, Stratagene). Membranes were analyzed by Northern blot hybridization as previously described (McMaster, M.T. et al., *J. Immunol.* 154(8):3771-3778, 1995).

25 As shown in Figure 3, Bolekine mRNA transcripts were detected. A 2 kb transcript was detected at low levels in various tissues, with moderate levels of expression in spleen, lymph node, and colon, and highest levels in kidney and small intestine. No expression can be detected in lung and unstimulated peripheral blood leukocytes (PBL).

EXAMPLE 9: In Situ Hybridization Showing Expression Patterns

30 Formalin-fixed, paraffin-embedded normal and diseased human fetal and adult tissues were sectioned, deparaffinized, deproteinized in proteinase K (20 mg/ml) for 15 minutes at 37°C, and further processed for in situ hybridization as described (Lu, L.H., and N.A. Gillett, *Cell Vision*, 1:169-176, 1994). A [³³P] UTP-labeled antisense riboprobe was generated from a 463 bp PCR product (primer sequences as described for Northern analysis) and hybridized at 55°C overnight. The slides were dipped in Kodak NTB2 nuclear track emulsion and exposed for 4 weeks.

35 Fetal tissues examined include: placenta, umbilical cord, liver, kidney, adrenals, thyroid, lungs, heart, great vessels, esophagus, stomach, small intestine, spleen, thymus, pancreas, brain, eye, spinal cord, body wall,

WO 02/077028

PCT/US01/09552

pelvis and lower limb. Adult tissues examined include liver, kidney, adrenal myocardium, aorta, spleen, lymph node, pancreas, lung, skin, cerebral cortex (rm), hippocampus (rm), eye, stomach, gastric carcinoma, colon, colonic carcinoma, thyroid (chimp), parathyroid (chimp), ovary (chimp) and chondrosarcoma. Acetaminophen induced liver injury and hepatic cirrhosis.

5 Results are shown in Figures 4A-4E which are photomicrographs, including both dark field (right frame) and H&E stained tissue in bright field (left frame). An intense signal was visible in various human tissues. Figure 4A depicts normal skin which had specific strong expression in the epithelial cells of the stratum basale; this deepest most layer of the epidermis is the single cell thick layer of cells along the basement membrane which are the progenitors for all of the overlying epidermal cells in the skin. There was no expression in epidermal cells in the overlying layers (stratum spinosum, stratum granulosum etc.). Expression was also
10 apparent in the dermis, which is the connective tissue immediately underlying the epidermis. Figure 4B depicts fetal kidney. In the fetal kidney, expression was specific in developing tubules and expression was seen in the tubular epithelium. Figure 4C and Figure 4D are fetal gut and adult gut respectively. Sections of normal adult human large bowel and fetal bowel were evaluated for expression. Both bowel specimens had specific moderate to strong expression in a multifocal pattern within the lamina propria of villi. Figure 4E are sections of cerebrum
15 that were evaluated for expression. Sections of cerebrum had strong specific expression in a subset of superficial cortical neurons; the pattern was distinct and suggests delineation of a specific population of neurons present in the cortex.

EXAMPLE 10: Stimulatory Activity in Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) Assay (no.24)

20 This example shows that the polypeptides of the invention are active as stimulators of the proliferation of T-lymphocytes. Compounds which stimulate proliferation of lymphocytes are useful therapeutically where enhancement of an immune response is beneficial. A therapeutic agent may also take the form of antagonists of Bolekine, for example, murine-human chimeric, humanized or human antibodies against the polypeptide, which would be expected to inhibit T-lymphocyte proliferation.

25 The basic protocol for this assay is described in *Current Protocols in Immunology*, unit 3.12; edited by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober, National Institutes of Health, Published by John Wiley & Sons, Inc.

30 More specifically, in one assay variant, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are isolated from mammalian individuals, for example a human volunteer, by leukopheresis (one donor will supply stimulator PBMCs, the other donor will supply responder PBMCs). If desired, the cells are frozen in fetal bovine serum and DMSO after isolation. Frozen cells may be thawed overnight in assay media (37°C, 5% CO₂) and then washed and resuspended to 3 x 10⁶ cells/ml of assay media (RPMI; 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 1% glutamine, 1% HEPES, 1% non-essential amino acids, 1% pyruvate).

35 The stimulator PBMCs are prepared by irradiating the cells (about 3000 Rads). The assay is prepared by plating in triplicate wells a mixture of: 100:1 of test sample diluted to 1% or to 0.1%; 50:1 of irradiated stimulator cells and 50:1 of responder PBMC cells. 100 microliters of cell culture media or 100 microliter of CD4-IgG is used as the control. The wells are then incubated at 37°C, 5% CO₂ for 4 days. On day 5 and each well is pulsed with

WO 02/077028

PCT/US01/09552

tritiated thymidine (1.0 mCi/well; Amersham). After 6 hours the cells are washed 3 times and then the uptake of the label is evaluated.

In another variant of this assay, PBMCs are isolated from the spleens of Balb/c mice and C57B6 mice. The cells are teased from freshly harvested spleens in assay media (RPMI; 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 1% glutamine, 1% HEPES, 1% non-essential amino acids, 1% pyruvate) and the PBMCs are isolated by overlaying these cells over Lympholyte M (Organon Teknika), centrifuging at 2000 rpm for 20 minutes, collecting and washing the mononuclear cell layer in assay media and resuspending the cells to 1×10^7 cells/ml of assay media. The assay is then conducted as described above. The results of this assay for compounds of the invention are shown below in Table 7. Positive increases over control are considered positive with increases of greater than or equal to 180% being preferred. However, any value greater than control indicates a stimulatory effect for the test protein.

TABLE 7

PRO	PRO Concentration	Percent Increase Over Control
Bolekine	12.40 nM	112.0
Bolekine	124.00 nM	192.7

EXAMPLE 11: Skin Vascular Permeability Assay (no.64)

This assay shows that Bolekine stimulates an immune response and can induce inflammation by inducing mononuclear cell, eosinophil and PMN infiltration at the site of injection of the animal. This skin vascular permeability assay is conducted as follows. Hairless guinea pigs weighing 350 grams or more are anesthetized with ketamine (75-80 mg/Kg) and 5 mg/Kg Xylazine intramuscularly (IM). A sample of purified Bolekine polypeptide or a conditioned media test sample is injected intradermally onto the backs of the test animals with 100 μ L per injection site. It is possible to have about 10-30, preferably about 16-24, injection sites per animal. One mL of Evans blue dye (1% in physiologic buffered saline) is injected intracardially. Blemishes at the injection sites are then measured (mm diameter) at 1hr, 6 hrs and 24 hrs post injection. Animals were sacrificed at the appropriate time after injection. Each skin injection site is biopsied and fixed in paraformaldehyde. The skins are then prepared for histopathologic evaluation. Each site is evaluated for inflammatory cell infiltration into the skin. Sites with visible inflammatory cell inflammation are scored as positive. Inflammatory cells may be neutrophilic, eosinophilic, monocytic or lymphocytic.

At least a minimal perivascular infiltrate at the injection site is scored as positive, no infiltrate at the site of injection is scored as negative. Bolekine scored positive in this assay.

EXAMPLE 12: Neuronal differentiation of ES cells, (No. 137)

ES cells are grown at clonal density on 24-well plates in ES + LIF medium [to stop differentiation] for two days to establish small colonies. The medium is then changed to KSR medium, LIF containing various amounts of Bolekine protein and the ES clones are allowed to grow and differentiate for 7 days in culture. On the 7th day the cells are fixed and processed for immunocytochemistry with antibodies raised against the neuronal marker MAP2. The degree of neuronal differentiation is assessed using fluorescence microscopy.

WO 02/077028

PCT/US01/09552

ES media-High glucose DMEM- 10% Fetal Calf Serum- SC media supplement-plus LIF- KSR medium-GMEM- 10% KSR [Knock out serum replacement supplement]- glutamine- Pen/Strep- non-essential amino acids- and 2-ME. Fixation-4% paraformaldehyde- MAP2 antibody [Pharmingen] diluted 1:1000 in PBST [0.1% Triton] with 3% normal goat serum.

5 Results will be calculated as the % of ES colonies containing neurons and the % of neurons within individual colonies.

Wells that have neuronal colony and cell counts 10x above background will be considered positive, containing a protein that influences neuronal differentiation. Bolekine at a final concentration of 124.00 nM tested positive for neuronal differentiation.

10 EXAMPLE 13: Purification of Bolekine Polypeptides Using Specific Antibodies

Native or recombinant Bolekine polypeptides may be purified by a variety of standard techniques in the art of protein purification. For example, pro-Bolekine polypeptide, mature Bolekine polypeptide, or pre-Bolekine polypeptide is purified by immunoaffinity chromatography using antibodies specific for the Bolekine polypeptide of interest. In general, an immunoaffinity column is constructed by covalently coupling the anti-Bolekine polypeptide antibody to an activated chromatographic resin.

15 Polyclonal immunoglobulins are prepared from immune sera either by precipitation with ammonium sulfate or by purification on immobilized Protein A (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Likewise, monoclonal antibodies are prepared from mouse ascites fluid by ammonium sulfate precipitation or chromatography on immobilized Protein A. Partially purified immunoglobulin is covalently attached to a chromatographic resin such as CNBr-activated SEPHAROSE™ (Pharmacia LKB Biotechnology). The antibody is coupled to the resin, the resin is blocked, and the derivative resin is washed according to the manufacturer's instructions.

20 Such an immunoaffinity column is utilized in the purification of Bolekine polypeptide by preparing a fraction from cells containing Bolekine polypeptide in a soluble form. This preparation is derived by solubilization of the whole cell or of a subcellular fraction obtained via differential centrifugation by the addition of detergent or by other methods well known in the art. Alternatively, soluble Bolekine polypeptide containing a signal sequence may be secreted in useful quantity into the medium in which the cells are grown.

25 A soluble Bolekine polypeptide-containing preparation is passed over the immunoaffinity column, and the column is washed under conditions that allow the preferential absorbance of Bolekine polypeptide (e.g., high ionic strength buffers in the presence of detergent). Then, the column is eluted under conditions that disrupt antibody/Bolekine polypeptide binding (e.g., a low pH buffer such as approximately pH 2-3, or a high concentration of a chaotrope such as urea or thiocyanate ion), and Bolekine polypeptide is collected.

30 EXAMPLE 14: Drug Screening

This invention is particularly useful for screening compounds by using Bolekine polypeptides or binding fragment thereof in any of a variety of drug screening techniques. The Bolekine polypeptide or fragment employed in such a test may either be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or

WO 02/077028

PCT/US01/09552

located intracellularly. One method of drug screening utilizes eukaryotic or prokaryotic host cells which are stably transformed with recombinant nucleic acids expressing the Bolekine polypeptide or fragment. Drugs are screened against such transformed cells in competitive binding assays. Such cells, either in viable or fixed form, can be used for standard binding assays. One may measure, for example, the formation of complexes between Bolekine polypeptide or a fragment and the agent being tested. Alternatively, one can examine the diminution in complex formation between the Bolekine polypeptide and its target cell or target receptors caused by the agent being tested.

Thus, the present invention provides methods of screening for drugs or any other agents which can affect a Bolekine polypeptide-associated disease or disorder. These methods comprise contacting such an agent with an Bolekine polypeptide or fragment thereof and assaying (i) for the presence of a complex between the agent and the Bolekine polypeptide or fragment, or (ii) for the presence of a complex between the Bolekine polypeptide or fragment and the cell, by methods well known in the art. In such competitive binding assays, the Bolekine polypeptide or fragment is typically labeled. After suitable incubation, free Bolekine polypeptide or fragment is separated from that present in bound form, and the amount of free or uncomplexed label is a measure of the ability of the particular agent to bind to Bolekine polypeptide or to interfere with the Bolekine polypeptide/cell complex.

Another technique for drug screening provides high throughput screening for compounds having suitable binding affinity to a polypeptide and is described in detail in WO 84/03564, published on September 13, 1984. Briefly stated, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. As applied to a Bolekine polypeptide, the peptide test compounds are reacted with Bolekine polypeptide and washed. Bound Bolekine polypeptide is detected by methods well known in the art. Purified Bolekine polypeptide can also be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. In addition, non-neutralizing antibodies can be used to capture the peptide and immobilize it on the solid support.

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralizing antibodies capable of binding Bolekine polypeptide specifically compete with a test compound for binding to Bolekine polypeptide or fragments thereof. In this manner, the antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants with Bolekine polypeptide.

EXAMPLE 15: Rational Drug Design

The goal of rational drug design is to produce structural analogs of biologically active polypeptide of interest (*i.e.*, a Bolekine polypeptide) or of small molecules with which they interact, *e.g.*, agonists, antagonists, or inhibitors. Any of these examples can be used to fashion drugs which are more active or stable forms of the Bolekine polypeptide or which enhance or interfere with the function of the Bolekine polypeptide *in vivo* (*c.f.*, Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991)).

In one approach, the three-dimensional structure of the Bolekine polypeptide, or of a Bolekine polypeptide-inhibitor complex, is determined by x-ray crystallography, by computer modeling or, most typically, by a combination of the two approaches. Both the shape and charges of the Bolekine polypeptide must be

WO 02/077028

PCT/US01/09552

ascertained to elucidate the structure and to determine active site(s) of the molecule. Less often, useful information regarding the structure of the Bolekine polypeptide may be gained by modeling based on the structure of homologous proteins. In both cases, relevant structural information is used to design analogous Bolekine polypeptide-like molecules or to identify efficient inhibitors. Useful examples of rational drug design may include molecules which have improved activity or stability as shown by Braxton and Wells, Biochemistry, 31:7796-7801 (1992) or which act as inhibitors, agonists, or antagonists of native peptides as shown by Athauda *et al.*, J. Biochem., 113:742-746 (1993).

It is also possible to isolate a target-specific antibody, selected by functional assay, as described above, and then to solve its crystal structure. This approach, in principle, yields a pharmacore upon which subsequent drug design can be based. It is possible to bypass protein crystallography altogether by generating anti-idiotypic antibodies (anti-ids) to a functional, pharmacologically active antibody. As a mirror image of a mirror image, the binding site of the anti-ids would be expected to be an analog of the original receptor. The anti-id could then be used to identify and isolate peptides from banks of chemically or biologically produced peptides. The isolated peptides would then act as the pharmacore.

By virtue of the present invention, sufficient amounts of the Bolekine polypeptide may be made available to perform such analytical studies as X-ray crystallography. In addition, knowledge of the Bolekine polypeptide amino acid sequence provided herein will provide guidance to those employing computer modeling techniques in place of or in addition to x-ray crystallography.

Deposit of Material

The following materials have been deposited with the American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

<u>Material</u>	<u>ATCC Dep. No.</u>	<u>Deposit Date</u>
DNA39523-1192 (Bolekine)	209424	October 31, 1997

These deposits were made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty). This assures maintenance of a viable culture of the deposit for 30 years from the date of deposit. The deposits will be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an agreement between Genentech, Inc. and ATCC, which assures permanent and unrestricted availability of the progeny of the culture of the deposit to the public upon issuance of the pertinent U.S. patent or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures availability of the progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto according to 35 USC § 122 and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 CFR § 1.14 with particular reference to 886 OG 638).

The assignee of the present application has agreed that if a culture of the materials on deposit should die or be lost or destroyed when cultivated under suitable conditions, the materials will be promptly replaced on

WO 02/077028

PCT/US01/09552

notification with another of the same. Availability of the deposited material is not to be construed as a license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

5 The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. The present invention is not to be limited in scope by the construct deposited, since the deposited embodiment is intended as a single illustration of certain aspects of the invention and any constructs that are functionally equivalent are within the scope of this invention. The deposit of material herein does not constitute an admission that the written description herein contained is inadequate to enable the practice of any aspect of the invention, including the best mode thereof, nor is it to be construed as limiting the scope of the claims to the specific illustrations that it represents. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

10

WO 02/077028

PCT/US01/09552

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated nucleic acid molecule which comprises (a) a DNA molecule encoding a Bolekine polypeptide comprising the sequence of amino acid residues from about 1 or about 34 to about 111 of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or (b) the complement of the DNA molecule of Bolekine (a).
- 5
2. The isolated nucleic acid molecule of Claim 1 comprising the sequence of nucleotide positions from about 167 or about 269 to about 499 of Figure 1 (SEQ ID NO:1).
3. The isolated nucleic acid molecule of Claim 1 comprising the nucleotide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1).
- 10
4. The isolated nucleic acid molecule of Claim 1 comprising the full-length polypeptide coding sequence of the human protein cDNA deposited with the ATCC on October 31, 1997 under ATCC Deposit No. 209424 (DNA39523-1192).
- 15
5. An isolated nucleic acid molecule comprising DNA which comprises (a) a DNA molecule encoding the same mature polypeptide encoded by the human protein cDNA deposited with the ATCC on October 31, 1997 under ATCC Deposit No. 209424 (DNA39523-1192), or (b) the complement of the DNA molecule of (a).
- 20
6. A nucleic acid molecule deposited with the ATCC under accession number 209424 (DNA39523-1192).
7. An isolated nucleic acid molecule encoding a Bolekine polypeptide comprising DNA that hybridizes to the complement of the nucleic acid sequence that encodes amino acids 1 or about 34 to about 111 of Figure 2 (SEQ ID NO:2).
- 25
8. The isolated nucleic acid molecule of Claim 7, wherein the nucleic acid that encodes amino acids 1 or about 34 to about 111 of Figure 2 (SEQ ID NO:2) comprises nucleotides 167 or about 269 to about 499 of Figure 1 (SEQ ID NO:1).
- 30
9. The isolated nucleic acid molecule of Claim 7, wherein the hybridization occurs under stringent hybridization and wash conditions.
- 35
10. A vector comprising the nucleic acid molecule of Claim 1 .
11. The vector of Claim 10, wherein said nucleic acid molecule is operably linked to control

WO 02/077028

PCT/US01/09552

sequences recognized by a host cell transformed with the vector.

12. A host cell comprising the vector of Claim 10.
13. The host cell of Claim 12, wherein said cell is a CHO cell, an *E. coli*. bacterium, or a yeast
5 cell.
14. A process for producing a Bolekine polypeptide comprising culturing the host cell of Claim
12 under conditions suitable for expression of said Bolekine polypeptide and recovering said Bolekine
polypeptide from the cell culture.
- 10 15. The isolated Bolekine polypeptide comprising amino acid residues 1 or about 34 to about 111
of Figure 2 (SEQ ID NO:2).
16. The isolated Bolekine polypeptide which is encoded by the cDNA insert of the vector deposited
15 with the ATCC on October 31, 1997 as ATCC Deposit No. 209424 (DNA39523-1192).
17. An isolated Bolekine polypeptide comprising the sequence of amino acid residues from 1 or
about 34 to about 111 of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or a fragment thereof sufficient to provide a binding site for
an anti-Bolekine antibody.
- 20 18. An isolated polypeptide produced by (i) hybridizing a test DNA molecule under stringent
conditions with (a) a DNA molecule encoding a Bolekine polypeptide comprising the sequence of amino acid
residues from 1 or about 34 to about 111 of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or (b) the complement of the DNA
molecule of (a), (ii) culturing a host cell comprising said test DNA molecule under conditions suitable for the
25 expression of said polypeptide, and (iii) recovering said polypeptide from the cell culture.
19. A chimeric molecule comprising a Bolekine polypeptide fused to a heterologous amino acid
sequence.
- 30 20. The chimeric molecule of Claim 19, wherein said heterologous amino acid sequence is an
epitope tag sequence.
21. The chimeric molecule of Claim 19, wherein said heterologous amino acid sequence is a Fc
region of an immunoglobulin.
- 35 22. An antibody which specifically binds to a Bolekine polypeptide.

WO 02/077028

PCT/US01/09552

23. The antibody of Claim 22, wherein said antibody is a monoclonal antibody.
24. The antibody of Claim 22 wherein said antibody is a humanized antibody or an antibody fragment.
- 5 25. An agonist to a Bolekine polypeptide.
26. An antagonist to a Bolekine polypeptide.
27. A composition of matter comprising (a) a Bolekine polypeptide, (b) an agonist to a Bolekine polypeptide, (c) an antagonist to a Bolekine polypeptide, or (d) an anti-Bolekine antibody, in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier.
- 10 28. The composition of matter of Claim 27, which is useful for the treatment of an immune related disease in a mammal.
- 15 29. The composition of matter of Claim 27, wherein (a), (b), (c) or (d) is capable of (i) enhancing the proliferation of T-lymphocytes in a mammal, or (ii) increasing infiltration of inflammatory cells into a tissue of a mammal.
- 20 30. The composition of matter of Claim 27 comprising a therapeutically effective amount of (a), (b), (c) or (d).
31. An article of manufacture, comprising:
a container;
25 a label on said container; and
a composition of matter comprising (a) a polypeptide of Claim 17, (b) an agonist of said polypeptide, (c) an antagonist of said polypeptide, or (d) an antibody that binds to said polypeptide, contained within said container, wherein label on said container indicates that said composition of matter can be used for treating an immune related disease.
- 30 32. A method of treating an immune related disorder in a mammal in need thereof comprising administering to said mammal a therapeutically effective amount of (a) a polypeptide of Claim 17, (b) an agonist of said polypeptide, (c) an antagonist of said polypeptide, or (d) an antibody that binds to said polypeptide.
- 35 33. The method of Claim 32, wherein the immune related disorder is systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, juvenile chronic arthritis, a spondyloarthropathy, systemic sclerosis, an idiopathic inflammatory myopathy, Sjögren's syndrome, systemic vasculitis, sarcoidosis, autoimmune hemolytic

WO 02/077028

PCT/US01/09552

- anemia, autoimmune thrombocytopenia, thyroiditis, diabetes mellitus, immune-mediated renal disease, a demyelinating disease of the central or peripheral nervous system, idiopathic demyelinating polyneuropathy, Guillain-Barré syndrome, a chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, a hepatobiliary disease, infectious or autoimmune chronic active hepatitis, primary biliary cirrhosis, granulomatous hepatitis, sclerosing cholangitis, inflammatory bowel disease, gluten-sensitive enteropathy, Whipple's disease, an autoimmune or immune-mediated skin disease, a bullous skin disease, erythema multiforme, contact dermatitis, psoriasis, an allergic disease, asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, food hypersensitivity, urticaria, an immunologic disease of the lung, eosinophilic pneumonias, idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis, a transplantation associated disease, graft rejection or graft-versus-host-disease.
- 5
- 10 34. A method for determining the presence of a Bolekine polypeptide in a sample suspected of containing said polypeptide, said method comprising exposing said sample to an anti-Bolekine antibody and determining binding of said antibody to a component of said sample.
- 15 35. A method of diagnosing an immune related disease in a mammal, said method comprising detecting the level of expression of a gene encoding Bolekine polypeptide (a) in a test sample of tissue cells obtained from the mammal, and (b) in a control sample of known normal tissue cells of the same cell type, wherein a higher or lower level of expression of said gene in the test sample as compared to the control sample is indicative of the presence of an immune related disease in the mammal from which the test tissue cells were obtained.
- 20 36. A method of diagnosing an immune related disease in a mammal, said method comprising (a) contacting an anti-Bolekine antibody with a test sample of tissue cells obtained from said mammal and (b) detecting the formation of a complex between the antibody and the polypeptide in the test sample, wherein formation of said complex is indicative of the presence of an immune related disease in the mammal from which the test tissue cells were obtained.
- 25 37. A method of identifying a compound that inhibits the activity of a Bolekine polypeptide, said method comprising contacting cells which normally respond to said polypeptide with (a) said polypeptide and (b) a candidate compound, and determining the lack responsiveness by said cell to (a).
- 30 38. A method of identifying a compound that inhibits the expression of a gene encoding a Bolekine polypeptide, said method comprising contacting cells which normally express said polypeptide with a candidate compound, and determining the lack of expression said gene.
- 35 39. The method of Claim 38, wherein said candidate compound is an antisense nucleic acid.
40. A method of identifying a compound that mimics the activity of a Bolekine polypeptide, said

WO 02/077028

PCT/US01/09552

method comprising contacting cells which normally respond to said polypeptide with a candidate compound, and determining the responsiveness by said cell to said candidate compound.

41. A method of stimulating the proliferation of T-lymphocytes, said method comprising contacting T-lymphocytes with an effective amount of (a) a Bolekine polypeptide or (b) an agonist of (a), wherein the proliferation of said T-lymphocytes is stimulated.

42. A method of inhibiting the proliferation of T-lymphocytes, said method comprising contacting T-lymphocytes with an effective amount of an antagonist of a Bolekine polypeptide, wherein the proliferation of said T-lymphocytes is inhibited.

43. A method of enhancing the infiltration of inflammatory cells into a tissue of a mammal, said method comprising administering to said tissue an effective amount of (a) Bolekine polypeptide or (b) an agonist of (a), wherein said infiltration is enhanced.

44. The method of Claim 43, wherein said inflammatory cells are mononuclear cells, eosinophils or polymorphonuclear neutrophils (PMNs).

45. A method of inducing the differentiation of pluripotent cells into neuronal cells in a mammal, said method comprising administering an effective amount of (a) a Bolekine polypeptide or (b) an antagonist of Bolekine polypeptide, wherein said cells differentiate to a state wherein neuronal markers can be detected.

46. The method of Claim 45, wherein said neuronal marker is MAP2.

FIGURE 1

GGGAGACAAAGCCAGAGCGCAGCGCACGGCCACAGACAGCCCTGGGGCATCCACCGACGG
CGCAGCCCGGAGCCAGCAGAGCCGGAAGCGCGCCCGGGCAGAGAAAGCCGAGCAGAGCT
GGGTGGCGTCTCCGGGCGCGCTCCGACGGGCCAGCGCCCTCCCCATGCTCCCTGCTCCC
ACGCCGCGCCCTCCGGTCAGCATGAGGCTCCCTGGCGCGCGCTGCTCCTGCTGCTGCT
GGCGCTGTACACCGCGCTGTGGACGGGTCCAAATGCAAGTGTCCCGGAAGGGACCCAA
GATCCGCTACAGCGACCTGAAGAGCTGGAATGAGCCCAAAGTACC CGCACCTGCGAGGA
GAAGATGTTATCATCACCAAGAGCGGTGCCAGGTACCGAGGTCAGGAGCACTGCCT
GCACCCCAAGCTGCAGAGCACCAAGCGCTTCATCAGTGGTACACCGCTGGAACGAGAA
GGCAGGGTCTACGAGAAATAGGGTGA AAAACCTCAGAGGGGAAAACCTCAAACCAAGTTG
GGAGACTTGTGCAAGGACTTTGCAGATTAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAGCCTTTCTTTCACAGGCATAAGACACAAATTAATATTTATGA
AGCACTTTTACCAACGGTCAGTTTTTACATTTATAGCTGCGTGCAGAAAGGCTCCAGA
TGGGAGACCCATCTCTCTGTGCTCCAGACTTCATCACAGGCTGCTTTTATCAAAAAG
GGAAAACTCATGCCCTTCTTTTAAAAAATGCTTTTGTATTTGTCCATACGTCACTA
TACATCTGAGCTTTATAAGCGCCCGGAGGAAACAATGAGCTTGGTGGACACATTTCAATG
CAGTGTGCTCCATTCCTAGCTTGGGAAGCTTCGCTTAGAGGCTCCTGGCGCCTCGGCAC
AGCTGCCACGGGCTCTCCTGGCTTATGGCGGTACAGCCTCAGTGTGACTCCACAGTG
GCCCTGTAGCCGGCAAGCAGGAGCAGGTCTCTCTGCATCTGTCTCTGAGGAACTCAA
GTTTGGTTGCCAGAAAATGTGCTTCATTC CCCCCTGGTTAATTTTACACCCCTAGGA
AACATTTCCAAGATCCTGTGATGGCGAGACAAATGATCCTTAAAGAGGTGTGGGCTCT
TCCCAACCTGAGGATTTCTGAAGGTTACAGGTTCAATATTTAATGCTTCAGAAGCAGT
TGAGGTTCCCAACTGTACGAAAAACCTTAGAGAAAACTTAAAAATATATGAAATACA
TGCCCAATACACAGCTACAGACACACATTTCTGTGACRAGGAAAACCTTCAAAGCATGT
TCTTTCCCTCACCAACAGAACATGCAGTACTAAAGCAATATATTTGTGATTC CCCCAT
GTAATCTTCAATGPTAAACAGTGCAGTCTCTTTGGAAGCTAAGATGACCTTGGCGCC
TTTCTCTGTACATATACCTTAAGAACGCCCTCCACACACTGCCCCCAAGTATATGC
CGCATTTACTGCTGTGTTATATGCTATGTACATGTACAGAAACCAATAGCATTTGCATGCA
GGTTTCATATCTTTCTAAGATGGAAAGTAATAAATATATTTGAAATGTAAAAA AAAAA
AAAA

WO 02/077028

PCT/US01/09552

2/8

FIGURE 2

MSLLPFRAPPFVSMRLLAAALLLLLLALYTARVDGSKCKCERKGPKIRYSDVKKLEMKPKYPHCEE
KMWIITTKSVSRYRQQBHCLHPKLGSTKRFIKWYNANBKRRVYEE

Signal sequence
1-34

N-myristoylation site.
80-85

WO 02/077028

PCT/US01/09552

4/8

FIGURE 4A

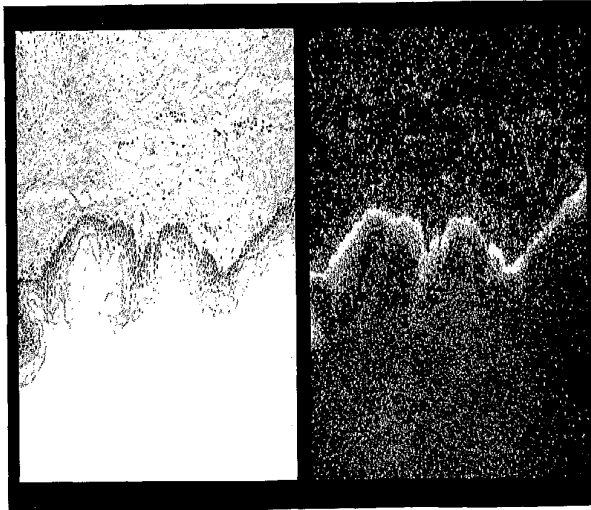
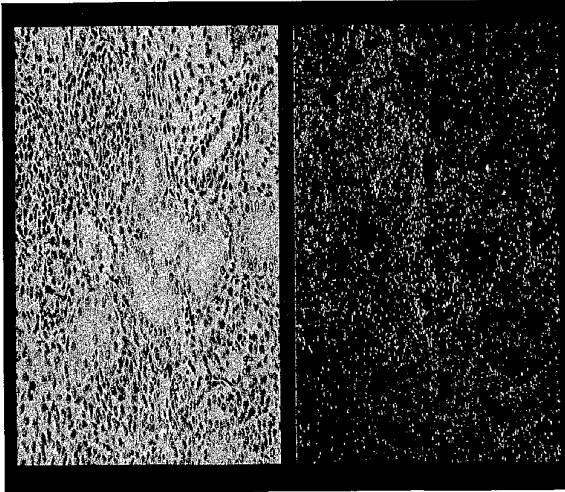


FIGURE 4B



WO 02/077028

PCT/US01/09552

6/8

FIGURE 4C

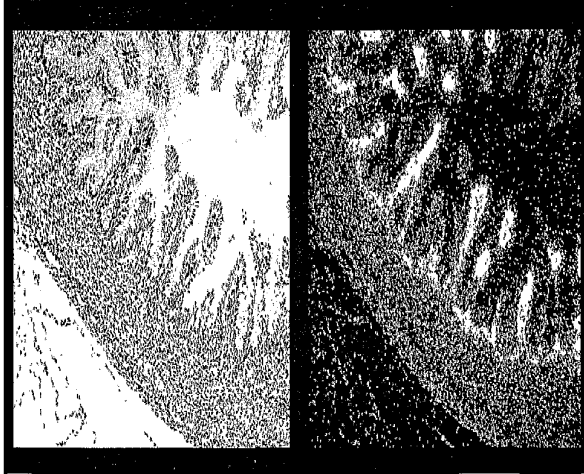
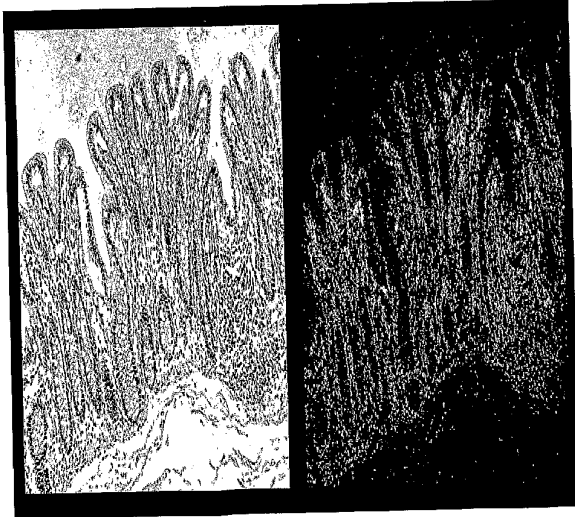


FIGURE 4D

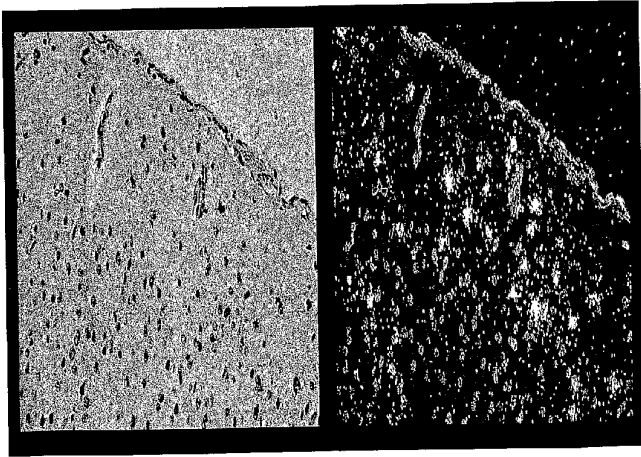


WO 02/077028

PCT/US01/09552

8/8

FIGURE 4E



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 01/09552
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/52 C12N15/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-internal, BIOSIS, MEDLINE, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 01 77338 A (SUGEN INC ;WHYTE DAVID (US); CAENEPEEL SEAN (US); MANNING GERARD ()) 18 October 2001 (2001-10-18) the whole document	1-3, 7-15, 17-24, 28-46
X	US 6 080 546 A (COWSERT LEX M ET AL) 27 June 2000 (2000-06-27) abstract column 41 -column 52 claim 1 --- -/--	1-3, 7-15, 17-24, 28-46
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel, or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 11 April 2002		Date of mailing of the international search report 26/04/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fac. (+31-70) 340-2016		Authorized officer Panzica, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/09552

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WANG XUHONG SUNNY ET AL: "Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase kinase" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 271, no. 49, 1996, pages 31607-31611, XP002182275 ISSN: 0021-9258 abstract page 1</p>	<p>1-3, 7-15, 17-24, 28-46</p>
X	<p>GROVE J R ET AL: "CLONING AND EXPRESSION OF TWO HUMAN P70 S6 KINASE POLYPEPTIDES DIFFERING ONLY AT THEIR AMINO TERMINI" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 11, no. 11, 1 November 1991 (1991-11-01), pages 5541-5550, XP002051876 ISSN: 0270-7306 abstract figure 1</p>	<p>1-3, 7-15, 17-24</p>
E	<p>WO 01 66594 A (PLOWMAN GREGORY D.; SUGEN INC (US); WHYTE DAVID (US); MANNING GERAR) 13 September 2001 (2001-09-13) abstract example 1 figure 1A</p>	<p>1-3, 7-15, 17-24, 28-46</p>
A	<p>ICHIJO HIDENORI ET AL: "Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 275, no. 5296, 1997, pages 90-94, XP002195822 ISSN: 0036-8075 the whole document</p>	<p>1-3, 7-15, 17-24</p>

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

International Application No. PCT/US 01 09552

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 25-27

Present claims 25 to 27 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely to be agonist or antagonist to a Bolekine polypeptide

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/US 01/09552

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0177338	A	18-10-2001	AU 5151001 A	23-10-2001
			WO 0177338 A2	18-10-2001
US 6080546	A	27-06-2000	AU 6115400 A	13-02-2001
			WO 0107461 A1	01-02-2001
WO 0166594	A	13-09-2001	AU 4196101 A	17-09-2001
			WO 0166594 A2	13-09-2001
			AU 3454401 A	07-08-2001
			WO 0155356 A2	02-08-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 5
A 6 1 P 5/00	A 6 1 P 5/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 7/04	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/04	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/02	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	P
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	B
// C 1 2 P 21/08	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 ゴッダード, オードリー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 3 1, サン フランシスコ, コンゴ ストリート 1 1
 0

(72)発明者 ヒラン, ケネス, ジェー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 4, サン フランシスコ, スーワード ストリート
 6 4

(72)発明者 ロス, アイリス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 7, サン フランシスコ, バルナッサス アベニュー
 1 番 2 5 1

(72)発明者 ウッド, ウィリアム, アイ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, ヒルズバラ, サウスダウン コート 3 5

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 CA17 CB01 CB17 CB21 DA12 DA13
 DA14 DA36 DA77 FB03

4B024 AA01 AA11 BA41 BA61 CA04 CA07 DA02 DA05 DA06 DA11
EA02 EA04 GA01 GA11 HA08 HA12

4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QQ61 QQ91 QR08 QR32
QR41 QR42 QR50 QR55 QR62 QR66 QR72 QR77 QS03 QS25
QS28 QS34 QS36 QS39

4B064 AG01 AG26 AG27 CA02 CA05 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01
DA13

4B065 AA01X AA57X AA87X AA93Y AB01 AB02 BA02 BA08 CA24 CA25
CA44 CA46

4C084 AA02 AA07 AA16 BA44 MA02 NA14 ZA021 ZA201 ZA531 ZA551
ZA591 ZA751 ZA811 ZA891 ZA941 ZA961 ZB051 ZB071 ZB151 ZC061
ZC351

4C085 AA13 AA14 EE03

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20
EA50 FA74

专利名称(译)	Bolequine多肽和核酸		
公开(公告)号	JP2005502317A	公开(公告)日	2005-01-27
申请号	JP2002576286	申请日	2001-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	フォンシャーマン ゴッダードオードリー ヒランケネスジェー ロスアイリス ウッドウィリアムアイ		
发明人	フォン, シャーマン ゴッダード, オードリー ヒラン, ケネス, ジェー. ロス, アイリス ウッド, ウィリアム, アイ.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/04 A61P7/06 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P25 /02 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/47 C07K14/52 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/02 A61P29/00 C07K14/521		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/04 A61P7/06 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/02 A61P29/00.101 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.P C12N5/00.B A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CA17 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045 /CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024 /DA06 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063 /QQ91 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063 /QS36 4B063/QS39 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA16 4C084/BA44 4C084/MA02 4C084 /NA14 4C084/ZA021 4C084/ZA201 4C084/ZA531 4C084/ZA551 4C084/ZA591 4C084/ZA751 4C084 /ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZA941 4C084/ZA961 4C084/ZB051 4C084/ZB071 4C084/ZB151 4C084 /ZC061 4C084/ZC351 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/EE03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045 /EA50 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及Bolekine多肽和编码这些多肽的核酸分子。本文还提供了包含那些核酸序列的载体和宿主细胞，包含与异源多肽序列融合的本发明多肽的嵌合多肽分子，与本发明多肽结合的抗体以及制备本发明多肽的方法发明。

int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
.1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 5
.6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 B 0 2 4
.6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 N	4 B 0 6 3
.6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 4
.6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	4 B 0 6 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 174 頁)		最終頁に終

出願番号	特願2002-576286 (P2002-576286)	(71) 出願人	596168317
(22) 出願日	平成13年3月22日 (2001. 3. 22)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
翻訳文提出日	平成15年9月22日 (2003. 9. 22)		GENENTECH, INC.
国際出願番号	PCT/US2001/009552		アメリカ合衆国カリフォルニア・940
国際公開番号	W02002/077028		0-4990・サウス・サン・フランシ
国際公開日	平成14年10月3日 (2002. 10. 3)		スコ・ディーエヌエー・ウェイ・1
指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), JP, KR, MM, NZ, PE, PG, PH, RU, SG, SI, SK, TH, TN, TW, UA, US, UZ, VN, ZA, ZW), A (AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MG, MK, MN, MU, MW, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PK, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SM, SN, SR, ST, SV, SZ, TD, TG, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ZY)	(74) 代理人	100109726
			弁理士 岡田 吉隆
		(74) 代理人	100101199
			弁理士 小林 義教
		(72) 発明者	フォン, ジャーマン
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 94
			02, アラメダ, ベイシンサイド ウェ